



HAL
open science

Développement d'une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et de particules d'acide poly-lactique pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens

David da Costa

► To cite this version:

David da Costa. Développement d'une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et de particules d'acide poly-lactique pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens. Biotechnologies. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1244 . tel-03612040

HAL Id: tel-03612040

<https://theses.hal.science/tel-03612040v1>

Submitted on 17 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1244

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : **Biologie**
Disciplines : **Santé, biotechnologie & microbiologie**

Soutenue publiquement le 24/11/2020, par :
David DA COSTA

Développement d'une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et de particules d'acide poly-lactique pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens

Devant le jury composé de :

Pr. Stéphanie BRIANÇON, DR, Université Claude Bernard, Lyon
Dr. Christophe BELOIN, DR, Institut Pasteur, Paris
Pr. Marie-Paule MINGEOT, DR, Université de Louvain, Belgique
Dr. Thomas TRIMAILLE, MCU, Université Aix-Marseille
Dr. Christian PROVOT, DS, Biofilm Control, Saint-Beauzire
Dr. Bernard VERRIER, DR, Université Claude Bernard, Lyon
Dr. Charlotte PRIMARD, DG, Adjuvatis, Lyon

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Vice-Président de la Commission de Recherche

Directeur Général des Services

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID

M. Didier REVEL

M. Philippe CHEVALLIER

M. Jean-François MORNEX

M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche
en Biologie Humaine

Faculté d'Odontologie

Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles
Mérieux

Faculté de Médecine Lyon-Est

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
(ISTR)

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)

Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

Doyenne : Mme Dominique SEUX

Doyenne : Mme Carole BURILLON

Doyen : M. Gilles RODE

Directeur : M. Xavier PERROT

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)

Département Informatique

Département Mécanique

Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE
Lyon)

Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)

Institut National du Professorat et de l'Education

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Observatoire de Lyon

Polytechnique Lyon

UFR Biosciences

UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives (STAPS)

UFR Faculté des Sciences

Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO

Directeur : M. Behzad SHARIAT

Directeur M. Marc BUFFAT

Directeur : Gérard PIGNAULT

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Directeur : M. Christophe VITON

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

Directeur : Emmanuel PERRIN

Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Ces travaux ont été réalisés sous convention CIFRE, en collaboration étroite avec :

L'équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » de l'UMR CNRS 5305 (LBTI) à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines à Lyon, sous la direction du Dr. Bernard VERRIER



L'entreprise Adjuvatis à Lyon, sous la direction du Dr. Charlotte PRIMARD



À mes parents,

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux **Pr. Marie-Paule Mingeot, Dr. Christophe Beloin** et **Dr. Thomas Trimaille** pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie également les **Pr. Stéphanie Briançon** et **Dr. Christian Provot** pour avoir accepté de suivre mon projet du début à la fin en étant d'abord membres de mon comité de suivi de thèse puis examinateurs pour ma soutenance. Plus particulièrement, je remercie **Christian** pour ses nombreux conseils et sa disponibilité, avec qui j'ai pris grand plaisir à collaborer et échanger durant ces trois années.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon directeur de thèse, **Dr. Bernard Verrier**, et ma co-directrice, **Dr. Charlotte Primard**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce doctorat au sein d'Adjuvatis et du LBTI, et pour m'avoir laissé autant de liberté dans son exécution. Je remercie **Bernard** pour ses conseils formateurs et pour l'ambiance qui règne au sein du labo, sans quoi cette aventure n'aurait pas été si agréable. Je remercie également **Charlotte** pour son implication et son encadrement qui ont été prépondérants dans la réussite de cette thèse. Tu m'as permis d'en apprendre beaucoup sur les nanoparticules et sur le métier en général. Merci pour ta bonne humeur et ta zénitude à toute épreuve, c'est un plaisir de travailler dans de telles conditions ! Je tiens également à remercier le **Dr. Bernard Mandrand**, consultant chez Adjuvatis, pour son appui sans faille et ses remarques constructives au cours de ce projet.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe de Bernard et d'Adjuvatis. Merci à **Danielle, Céline, Naïma, Jean-Yves, Quentin, Damien, Dominique, Pierre, Perrine, Claire, Ulrich** et **Sophie** pour leur disponibilité et leur bonne humeur. J'ai pris beaucoup de plaisir à passer ces trois années à vos côtés. Je remercie **Pierre** pour ses nombreux conseils aussi bien pro que perso. Promis, je traverserai que quand le petit bonhomme est vert ! **Quentin**, un grand merci pour la touche brute de décoffrage que tu as apportée dans l'équipe. Merci à **Damien** pour ses connaissances sur l'HPLC, le PLA et la chimie en général qui m'ont bien aidé. Merci à **Dominique** pour son aide précieuse en microscopie et pour le calendrier. Je crois que j'ai mis mon gant dans la blouse ! Je remercie également **Sophie, Céline, Perrine** et **Claire** pour avoir répondu présent à chaque fois que j'en avais besoin. Merci à **Jean-Yves** pour son avis pertinent sur mes travaux. Je tiens également à remercier les anciens membres : **Maxime** qui a été force de conseils, et la team de stagiaires **Val, Almu, Chiara** et **Lili** avec qui tout a commencé.

Un grand merci à tous les doctorants et jeunes docteurs de l'équipe avec qui j'ai pu partager ces trois années : **Camille, Alex, Anne-Line, Alix, Alice, Mehwish, Myriam, Sergio, Sophie, Lili, Altan et Stavroula**. J'en retiens beaucoup d'entraide et des apéros très animés ! Thank you for all **Sergio**, always a pleasure to learn some practical Spanish expressions. ¿ Qué pasa con tu rollo, tío ? Un grand merci à **Camille** pour tous ces grands moments et ces Kinder... et aux prochains ! Many thanks to **Stav** for her support and her kindness. **Altan**, merci pour ces très bons moments dans et en dehors du labo ! Je remercie également **Alix** avec qui j'ai partagé cette aventure haute en couleurs. A notre futur titre de docteur !

Je remercie les stagiaires que j'ai encadrés au cours de ma thèse, **Chloé et Basile**, les « microscopeurs », ainsi que **Fanny**. J'ai eu la chance d'avoir des étudiants brillants et impliqués dans leur travail. Merci pour votre contribution à ce projet, sans vous il n'en serait pas là.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'IBCP, **Alexis et Samuel** pour leurs coups de pouce en informatique et **Lotfi** pour notre petite invention de table à bec bunsen qui m'aura été bien utile. Merci à **Simon et Mourad** pour nos échanges très constructifs ! Et un grand merci à la team Afterwork et plus particulièrement à **Alexis, Guillaume, Léa, Ben et Cécile** pour ces soirées mémorables !

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes ayant participé à la réussite de cette thèse. Je remercie **Jason** pour m'avoir formé à la culture et l'analyse de biofilms et pour m'avoir fourni une précieuse souche de staph' sans laquelle mes travaux n'auraient pas pris la même trajectoire. Merci à **Bénédicte Martin** pour avoir complété ma formation à la culture et l'analyse de biofilms. Je remercie également **Elodie Chatre** du PLATIM pour ses précieux conseils en imagerie.

Je remercie mes amis et particulièrement **Raph, Théo, Alo, Mathou et JB** pour tous ces grands moments partagés en parallèle de ma thèse. A ma sœur **Karine** et à mes frères **Remy et Anthony**, je mesure la chance que j'ai de pouvoir compter sur vous. Keust à notre fratrie ! Mes remerciements s'adressent également à **Sylvie, Claude et Yves** pour leurs encouragements. Un immense merci à **Milena** pour tout l'amour que tu m'apportes, même si ces quelques mots ne suffiront pas. Merci de répondre tout le temps présent et de m'avoir toujours soutenu. Enfin, je remercie **mes parents** à qui je dédie cette thèse, pour m'avoir donné les moyens de voir les choses en grand et pour m'avoir toujours poussé à me surpasser. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous.

RESUME

Après l'âge d'or de la découverte des antibiotiques, les infections bactériennes représentent toujours un challenge considérable pour la santé publique mondiale. Le mode de croissance en biofilms est le principal responsable des infections chroniques pour lesquelles les thérapies antibiotiques sont en échec clinique, pointant la nécessité d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de cette thèse a porté sur le développement d'une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et de particules biodégradables d'acide poly-lactique pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens. Une stratégie de formulation d'antibiotiques a été développée, aboutissant à des particules stables et fortement chargées en rifampicine. La charge de surface des particules a été inversée vers des valeurs positives par adsorption d'un peptide cationique, la poly-lysine. L'intérêt d'une telle formulation a été évalué *in vitro* sur des biofilms de *Staphylococcus aureus*. Capables d'interagir *via* des liaisons électrostatiques avec les biofilms et les bactéries, les particules cationiques sont retenues en plus grande quantité dans les biofilms que les particules anioniques qui peuvent être éliminées par lavage. Les particules permettant une délivrance progressive de l'antibiotique, l'inversion de leur charge de surface qui renforce ces interactions permet de réduire les quantités d'antibiotique nécessaires pour maintenir une efficacité anti-biofilm. La combinaison de ce traitement avec la DNase, une enzyme capable de dégrader la matrice de biofilms, permet de potentialiser la dégradation des biofilms sans toutefois augmenter l'activité bactéricide de l'antibiotique. Des évaluations *in vivo* de l'efficacité de cette stratégie thérapeutique permettraient de confirmer son intérêt pour le traitement des biofilms bactériens.

Mots-clés : biofilm, bactéries, particules de PLA, antibiotique, agent anti-biofilm

SUMMARY

After the golden age of antibiotic discovery, bacterial infections still represent a major challenge for public health worldwide. The biofilm mode of growth is mostly responsible for chronic infections that antibiotic therapies fail to cure, pointing out the need to establish new therapeutic strategies. The aim of this thesis dealt with the development of a combinatory therapy based on anti-biofilm agents and poly-lactic biodegradable nanoparticles for antibiotic delivery within bacterial biofilms. An antibiotic formulation strategy was developed, leading to stable and highly rifampicin loaded particles. The particle surface charge was inverted to positive values by adsorbing a cationic peptide, poly-lysine. The impact of this formulation was evaluated *in vitro* on *Staphylococcus aureus* biofilms. Capable of electrostatic interactions with biofilms and bacteria, cationic particles are retained in larger quantity in biofilms than anionic ones which can be eliminated by washing. The particles enabling a sustained delivery of antibiotic, the surface charge inversion that strengthen those interactions allows to reduce the needed quantities of antibiotic to maintain an anti-biofilm efficacy. Combining this treatment with DNase, an enzyme able to degrade biofilm matrix, allows to potentiate the degradation of biofilms, however the bactericidal activity of the antibiotic was not enhanced. *In vivo* efficacy evaluation of this therapeutic strategy could confirm its interest for the treatment of bacterial biofilms.

Keywords: biofilm, bacteria, PLA particles, antibiotic, anti-biofilm agent

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	17
ABREVIATIONS	23
PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS	25
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
1. LES BIOFILMS BACTERIENS	28
1.1. Historique.....	28
1.2. Formation d'un biofilm.....	31
1.2.1. Adhésion des bactéries à une surface.....	31
1.2.2. Formation de micro-colonies	32
1.2.3. Maturation du biofilm.....	34
1.2.4. Dispersion du biofilm	35
1.3. Structure et composition d'un biofilm.....	35
1.3.1. Bactéries Gram négatif et Gram positif.....	36
1.3.2. Composants de la matrice et leurs rôles.....	37
1.3.2.1. Exopolysaccharides.....	38
1.3.2.2. Protéines extracellulaires.....	39
1.3.2.3. ADN extracellulaire	40
1.3.2.4. Vésicules membranaires	43
1.4. Infections associées aux biofilms.....	44
1.4.1. Infections associées au matériel médical.....	44
1.4.2. Infections chroniques.....	46
1.5. Récalcitrance aux antibiotiques.....	47
1.5.1. Résistance et tolérance aux antibiotiques : définitions.....	47
1.5.2. Processus multifactoriel de récalcitrance	48
1.5.2.1. Pénétration altérée des antibiotiques par séquestration dans la matrice.....	48
1.5.2.2. Microenvironnement favorable à l'émergence de bactéries persistantes	50
1.5.2.3. Conséquences des concentrations antibiotiques sous-inhibitrices	52
1.5.3. Impact de la diversité génétique au sein d'un biofilm.....	53
1.5.3.1. Transfert horizontal de gènes d'antibio-résistance	53
1.5.3.2. Mutagenèse bactérienne induite.....	53
1.5.4. Physiopathologie des biofilms bactériens : cas des infections d'implant par <i>S. aureus</i>	54
2. LES THERAPIES ANTI-BIOFILMS.....	56
2.1. Thérapies conventionnelles.....	56
2.1.1. Définition et activité d'un antibiotique	56
2.1.2. Classification des antibiotiques	57
2.1.3. Efficacité anti-biofilm de certains antibiotiques.....	58

2.2. Nouvelles approches anti-biofilms	59
2.2.1. Inhibition de la formation de biofilms	60
2.2.1.1. Inhibition de l'adhésion bactérienne à une surface	60
2.2.1.2. Inhibition de la production de matrice	61
2.2.1.3. Inhibition du <i>quorum sensing</i>	62
2.2.2. Eradication de biofilms établis	63
2.2.2.1. Dégradation enzymatique de la matrice.....	63
2.2.2.2. Activité bactéricide incluant les bactéries dormantes	65
2.2.2.2.1. Molécules biologiques à spectre total.....	65
2.2.2.2.2. Mesures physiques et chimiques d'éradication des biofilms	66
2.2.2.2.3. Thérapie à base de bactériophages.....	67
2.2.3. Combinaisons thérapeutiques multi-cibles	68
2.3. Développement clinique et industriel limité	69
2.3.1. Nouveaux antibiotiques	69
2.3.2. Thérapies anti-biofilms innovantes	70
3. LES SYSTEMES DE DELIVRANCE D'ANTIBIOTIQUES.....	72
3.1. Systèmes de délivrance de principes actifs	72
3.1.1. Généralités.....	72
3.1.2. Principaux vecteurs particuliers	72
3.1.2.1. Liposomes.....	73
3.1.2.2. Nanoparticules polymériques	74
3.2. Apport des systèmes de délivrance dans la lutte anti-biofilm	75
3.2.1. Divers avantages à la vectorisation d'antibiotiques	75
3.2.1.1. Protection contre les dégradations.....	76
3.2.1.2. Biodistribution améliorée	77
3.2.1.3. Pénétration dans les biofilms.....	77
3.2.1.4. Ciblage des bactéries	77
3.2.1.5. Fusion avec les membranes bactériennes	78
3.2.1.6. Libération prolongée d'antibiotiques.....	78
3.2.2. Combinaisons et co-délivrance d'antibiotiques et d'agents anti-biofilms.....	79
3.3. Optimisation des propriétés physicochimiques des systèmes de délivrance	81
3.3.1. Composition appropriée au microenvironnement des biofilms.....	81
3.3.2. Taille adaptée à la pénétration des biofilms	82
3.3.3. Surface optimisée pour l'accumulation dans les biofilms	83
3.4. Développement clinique et industriel limité	84
3.4.1. Formulations anti-biofilms en essais cliniques et sur le marché	84
3.4.2. Points limitants le développement des systèmes de délivrance	86
4. PROJET ET OBJECTIFS	87
RESULTATS	89

1. DEVELOPPEMENT DE FORMULATIONS ANTIBIOTIQUES ET ANTI-BIOFILMS A BASE D'I-PARTICLES® ...	90
1.1. Chargement d'antibiotiques dans les i-Particles®	90
1.1.1. Chargement de la clarithromycine	91
1.1.2. Formulation de la levofloxacin	95
1.1.3. Chargement de la rifampicine	97
1.2. Adsorption de biomolécules à la surface des i-Particles®	100
1.2.1. Inversion de la charge de surface des particules.....	100
1.2.2. Fonctionnalisation par un agent anti-biofilm	104
1.3. Discussion	106
1.4. Matériel & méthodes	107
1.4.1. Synthèse d'i-Particles® et fonctionnalisation	107
1.4.2. Caractérisations physico-chimiques des particules	108
1.4.3. Quantification des taux et efficacité de chargement	109
1.4.3.1. Quantification de la clarithromycine.....	110
1.4.3.2. Quantification de la levofloxacin.....	110
1.4.3.3. Quantification de la rifampicine.....	110
1.4.4. Quantification des taux et efficacité d'adsorption	111
1.4.2. Analyse statistique	111
2. EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE LA POTENTIALISATION DE LA RIFAMPICINE PAR SON CHARGEMENT DANS DES I-PARTICLES® ET PAR SA COMBINAISON AVEC LA DNASE CONTRE DES BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i> ...	112
2.1. Impact des i-Particles® et de leur charge de surface sur la délivrance de la rifampicine dans des biofilms de <i>S. aureus</i>	112
2.1.1. Characterization of drug-loaded and charge-reversed NPs	116
2.1.2. <i>In silico</i> simulation of NP/drug interactions	118
2.1.3. <i>In vitro</i> drug release from NPs.....	119
2.1.4. Antiplanktonic and antibiofilm properties of charge-reversed and antibiotic-loaded NPs	120
2.1.5. Increased NP/bacteria interaction by PLL corona enabled to enhance antibiotic delivery to planktonic bacteria	122
2.1.6. Slowed migration of PLL-coated NPs in biofilms	123
2.1.7. Enhanced NP accumulation by PLL corona improved antibiotic delivery in biofilms	125
2.1.8. Discussion.....	127
2.1.9. Material and methods.....	130
2.1.9.1. Preparation of drug-loaded and charge-reversed NPs	130
2.1.9.2. Nanoparticle characterization	130
2.1.9.3. Drug loading.....	131
2.1.9.4. Cell toxicity evaluation	131
2.1.9.5. <i>In silico</i> simulations	132
2.1.9.6. <i>In vitro</i> drug release	133
2.1.9.7. Bacterial strain and growth conditions	133
2.1.9.8. Antibiotic susceptibility test on planktonic bacteria	133

2.1.9.9. <i>In vitro</i> antibiofilm tests on 24h-old biofilms	134
2.1.9.10. NP interaction with planktonic bacteria and antiplanktonic activity	134
2.1.9.11. NP diffusion in biofilms	135
2.1.9.12. NP accumulation in biofilms and antibiofilm activity	136
2.1.9.13. Statistical analysis	137
2.2. Combinaison de la DNase avec la rifampicine contre des biofilms de <i>S. aureus</i>	137
2.2.1. Activité antibactérienne sur <i>S. aureus</i> planctonique.....	138
2.2.2. Inhibition de l'adhésion de <i>S. aureus</i>	139
2.2.3. Activité anti-biofilm sur des biofilms en formation et préformés	140
2.2.4. Activité antibactérienne sur des biofilms préformés	142
2.2.5. Discussion.....	144
2.2.6. Matériel et méthodes	146
2.2.6.1. Souche bactérienne et conditions de culture	146
2.2.6.2. Microdilution en bouillon et étalement sur gélose.....	146
2.2.6.3. Biofilm Ring Test®	147
2.2.6.4. Quantification de la biomasse adhérente de biofilms au Crystal Violet.....	148
2.2.6.5. Evaluation de la viabilité des bactéries en biofilms par fluorescence	148
2.2.6.6. Evaluation de l'activité métabolique des bactéries en biofilms au MTT	149
2.2.6.7. Analyse statistique.....	149
3. MISE EN PLACE DE L'ÉVALUATION <i>IN VIVO</i> DE L'EFFICACITÉ DE LA COMBINAISON THÉRAPEUTIQUE SUR UN MODÈLE MURIN D'INFECTION D'IMPLANT PAR DES BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i>	150
3.1. Modèle d'infection de cathéter	151
3.2. Mise au point préliminaire des outils	152
3.2.1. Capacité d'adhésion des bactéries à l'implant	152
3.2.2. Formulations injectables de rifampicine	153
3.3. Procédures expérimentales.....	153
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	159
1. DÉVELOPPEMENT D'I-PARTICLES® ADAPTÉES AU CHARGEMENT D'ANTIBIOTIQUES.....	160
2. UTILISATION D'I-PARTICLES® DANS LE TRAITEMENT DES BIOFILMS : UN OUTIL À FORT POTENTIEL .	163
3. COMBINAISON ENTRE ANTIBIOTIQUE ET AGENT ANTI-BIOFILM : UNE STRATÉGIE EFFICACE.....	166
CONCLUSION.....	168
ANNEXES.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Première image de biofilm bactérien observé sur des expectorations de patients atteints de mucoviscidose par microscopie optique, montrant des agrégats de bactéries entourés de <i>slime</i> (adapté d'Høiby <i>et al.</i> ¹⁰)	30
Figure 2. Résultats de l'évolution du nombre de publications associées au terme « biofilm » sur PubMed (au 09/11/2020).....	30
Figure 3. <i>Timeline</i> de la caractérisation clinique et pathologique des bactéries à celle du mode de vie en biofilms, et conséquences sur les thérapies antibactériennes (adapté de Garrison <i>et al.</i> ¹³)	31
Figure 4. Etapes de formation d'un biofilm (d'après Lebeaux et Ghigo ¹⁵)	31
Figure 5. Structure en « champignon » de biofilms de <i>S. aureus</i> adhérents à un cathéter, observée au microscope électronique à balayage et pseudo-colorée (bactéries en jaune et matrice en vert) (adapté de Rabin <i>et al.</i> ²⁸)	33
Figure 6. Systèmes de <i>quorum sensing</i> chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (d'après Ganesh et Rai ³⁰).....	33
Figure 7. Image de microscopie confocale d'un biofilm de <i>Bacillus subtilis</i> observé après injection d'une solution aqueuse contenant des billes de fluorophores et révélant l'architecture des canaux d'eau (d'après Wilking <i>et al.</i> ³⁴)	34
Figure 8. Structure des enveloppes bactériennes à Gram négatif et à Gram positif (adapté de Silhavy <i>et al.</i> ⁵⁰).....	36
Figure 9. Schéma de la composition et structure d'un biofilm (adapté de Karygianni <i>et al.</i> ⁴⁹)	37
Figure 10. Différentes fonctions de l'ADNe dans les biofilms (adapté d'Okshevsky et Meyer ²⁷)	41
Figure 11. Différents mécanismes de transfert horizontal de gènes chez la bactérie (adapté de von Wintersdorff <i>et al.</i> ⁷⁶)	42
Figure 12. Principales infections associées aux biofilms (d'après Lebeaux et Ghigo ¹⁵).....	44
Figure 13. Principaux mécanismes impliqués dans la récalcitrance des biofilms aux antibiotiques (d'après Lebeaux <i>et al.</i> ⁹⁵).....	48

Figure 14. Cinétique de pénétration de la tobramycine et de la ciprofloxacine marquées par de la Cy5 (respectivement Cy5-tob et Cy5-cipro) dans des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> (adapté de Tseng <i>et al.</i> ⁹⁶)	49
Figure 15. Mécanismes de persistance bactérienne et conséquences sur l'antibiothérapie (adapté d'Harms <i>et al.</i> ¹⁰⁸)	51
Figure 16. Détermination de la CMI et CMB d'un antibiotique pour une souche bactérienne donnée (adapté de Karaman ¹²⁹)	56
Figure 17. Différentes classes d'antibiotiques en fonction de leur cible dans la bactérie (adapté de Kapoor <i>et al.</i> ¹³⁰)	57
Figure 18. Stratégies thérapeutiques ciblant le mode de vie bactérien en biofilms (adapté de Karygianni <i>et al.</i> ⁴⁹)	59
Figure 19. Principales propriétés des dispositifs médicaux impactant l'adhésion bactérienne (adapté de Song <i>et al.</i> ¹³⁹)	60
Figure 20. Différentes stratégies d'inhibition du <i>quorum sensing</i> (d'après Mion <i>et al.</i> ¹⁴⁹).....	62
Figure 21. Images de la dispersion de <i>P. aeruginosa</i> bioluminescentes par un traitement de glycoside hydrolases dans un modèle de plaie murin (adapté de Fleming et Rumbaugh ¹⁵³) .	64
Figure 22. Relation temporelle entre l'introduction des antibiotiques en clinique et l'apparition de résistances (d'après Sierra <i>et al.</i> ¹⁹⁰)	70
Figure 23. <i>Pipeline</i> des différents AMPs en cours d'évaluation clinique (adapté de Sierra <i>et al.</i> ¹⁹⁰).....	71
Figure 24. Classification des systèmes de délivrance de principes actifs selon leur composition (adapté de Mahato <i>et al.</i> ²⁰²)	73
Figure 25. Structure et composition d'un liposome fonctionnalisé (adapté de Sercombe <i>et al.</i> ²⁰⁶).....	74
Figure 26. Mécanismes des nanoparticules pour améliorer la délivrance d'un antibiotique (adapté de Xiong <i>et al.</i> ²¹⁰)	76
Figure 27. Pénétration de nanomicelles marquées fluorescentes (rouge) dans un biofilm de <i>S. aureus</i> (vert), observée par microscopie confocale (adapté de Liu <i>et al.</i> ²¹⁷)	77
Figure 28. Illustration de la formulation développée par Tasia <i>et al.</i> et son effet sur des biofilms (d'après Tasia <i>et al.</i> ²²⁷)	80

Figure 29. Etat de guérison de la brûlure infectée de rats après 21 jours de traitement (adapté de Patel <i>et al.</i> ²²⁸)	81
Figure 30. Principe des micelles sensibles au pH acide et aux lipases développées par Chen <i>et al.</i> (adapté de Chen <i>et al.</i> ²³⁴)	82
Figure 31. Principe du ciblage charge-dépendant des particules développées par Radovic-Moreno <i>et al.</i> ⁵¹ sous l'effet du pH.....	84
Figure 32. Combinaison thérapeutique développée à base d'i-Particles®	87
Figure 33. Schéma de nanoprécipitation et de chargement de molécules dans les i-Particles®	90
Figure 34. Photographies de la suspension de NP-CLR avec un taux de chargement de 1% montrant l'aspect obtenu après évaporation des solvants lorsque la phase aqueuse est composée d'eau (à gauche) ou de bicarbonate 5 mM (à droite)	93
Figure 35. Distribution normale de la taille (en intensité) de NP-CLR possédant un taux de chargement théorique de 1%.....	93
Figure 36. Quantification de la LVX dans des NP à des taux de chargement théoriques croissants (bicarbonate à 5 mM).....	97
Figure 37. Efficacité et taux de chargement réel de la RIF dans les NP en fonction de la concentration de RIF totale (bicarbonate à 2 mM)	99
Figure 38. Taux de chargement de la RIF dans les NP et diamètre hydrodynamique en fonction du temps de stockage à 4°C (bicarbonate à 2 mM et taux de chargement théorique à 2%). Observation morphologique de NP fraîchement synthétisées (à gauche) et des NP-RIF (à droite) après 2 mois de stockage à 4°C par microscopie électronique à balayage	100
Figure 39. Structure chimique de la PLL.....	101
Figure 40. Observation morphologique de NP-RIF-PLL (bicarbonate à 2 mM, taux de chargement théorique à 2%, taux de solide à 0,25% et PLL à 500 µg/mL) par microscopie électronique à balayage	103
Figure 41. Efficacité et taux d'adsorption de la DNase sur les NP-RIF en fonction du taux de solide (bicarbonate à 2 mM)	104
Figure 42. Efficacité et taux d'adsorption de la DNase sur les NP-RIF selon la concentration de DNase (bicarbonate à 2 mM)	105

Figure 43. Observation morphologique de NP-RIF-DNase (bicarbonate à 2 mM, taux de chargement théorique à 2%, taux de solide à 0,25% et DNase à 100 µg/mL) par microscopie électronique à balayage	106
Figure 44. Schéma des possibles interactions entre NP (en gris) et antibiotique (en jaune) menant à l'agrégation des NP	107
Figure 45. Structure chimique du PLA.....	108
Figure 46. Characterization of NPs functionalized by antibiotic and fluorophore loading and by cationic peptide adsorption.	117
Figure 47. <i>In silico</i> simulation of interactions between rifampicin and PLL within NPs.	118
Figure 48. Drug behavior within antibiotic-loaded and PLL-coated NPs in PBS at 37°C.....	119
Figure 49. <i>In vitro</i> effect of antibiotic in soluble and formulated forms on <i>S. aureus</i> under planktonic and biofilm modes of growth.....	121
Figure 50. Interaction of NPs and PLL-coated NPs with planktonic <i>S. aureus</i>	122
Figure 51. Migration of NPs and PLL-coated NPs in <i>S. aureus</i> biofilms.	124
Figure 52. Accumulation of NPs and PLL-coated NPs in <i>S. aureus</i> biofilms.....	125
Figure 53. Exemple de résultat obtenu avec le Biofilm Ring Test®	139
Figure 54. Biomasse adhérente relative de biofilms de <i>S. aureus</i> en formation, marquée au Crystal Violet, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B).....	140
Figure 55. Biomasse adhérente relative de biofilms de <i>S. aureus</i> préformés, marquée au Crystal Violet, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B)	141
Figure 56. Viabilité bactérienne de biofilms de <i>S. aureus</i> préformés, révélée par marquage <i>live/dead</i> observé au microscope confocal, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B)	142
Figure 57. Micrographies de biofilms de <i>S. aureus</i> préformés, observés au microscope confocal (marquage <i>live/dead</i>) en présence de RIF ou DNase, seules et combinées.....	143
Figure 58. Activité métabolique bactérienne de biofilms de <i>S. aureus</i> préformés, révélée par MTT, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B)	144

Figure 59. Principe du Biofilm Ring Test® (d'après Biofilm Control).....	147
Figure 60. Photographies représentatives des procédures chirurgicales établies dans le modèle d'infection d'implant sous-cutané (adapté de Stavrakis <i>et al.</i> ²⁹⁷ , en haut, et de Nowakowska <i>et al.</i> ²⁹⁸ , en bas).....	152
Figure 61. Organigramme des procédures expérimentales pour l'évaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité et de la toxicité de la combinaison thérapeutique développée.....	154
Figure 62. Chronogramme de la première procédure expérimentale.....	154
Figure 63. Poids des souris (en haut) et charge bactérienne dénombrée sur les implants après mise à mort (en bas) de souris infectées ou non par 10 ⁴ UFC/implant durant 3 ou 5 jours .	155
Figure 64. Poids des souris (en haut) et charge bactérienne dénombrée sur les implants après mise à mort (en bas) de souris infectées par 0, 10 ⁴ et 10 ⁶ UFC/implant durant 3 jours.....	156
Figure 65. Chronogramme de la seconde procédure expérimentale	157
Figure 66. Chronogramme de la troisième procédure expérimentale	158
Figure 67. Structure chimique de la poly-L-histidine (PLH).....	165
Tableau 1. Caractéristiques des antibiotiques sélectionnés pour leur formulation dans des i-Particles®	91
Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques de NP et de NP chargées en CLR en fonction de la phase aqueuse utilisée lors de la nanopréciptation (eau purifiée ou solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 5 mM) et du taux de chargement en CLR.....	92
Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques de NP-CLR à des taux de chargement croissants (bicarbonate à 5 mM).....	94
Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques de NP-LVX avec des concentrations croissantes de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium dans la phase aqueuse de nanopréciptation (taux de chargement théorique de LVX à 2%)	95
Tableau 5. Caractéristiques physico-chimiques de NP-LVX à des taux de chargement théoriques croissants (bicarbonate à 5 mM)	96
Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF avec des concentrations croissantes de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium dans la phase aqueuse de nanopréciptation (taux de chargement théorique de RIF à 1%)	98

Tableau 7. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF à des taux de chargement croissants (bicarbonate à 2 mM).....	99
Tableau 8. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL synthétisées dans de l'eau ou du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%).....	102
Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL avec des taux de solide croissants de NP pour une concentration fixe de PLL de 750 µg/mL dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)	102
Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL avec des concentrations croissantes de PLL pour un taux de solide fixe de NP de 0,25% dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)	103
Tableau 11. Caractéristiques physico-chimiques de la formulation optimisée de NP-RIF-DNase dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)	105
Tableau 12. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de la RIF seule, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou combinée avec la DNase	138
Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices de biofilms (CMIb) de la RIF seule, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou combinée avec la DNase	140
Tableau 14. Comparaison des coupes transversales obtenues par dynamique des particules dissipatives pour la simulation des interactions entre NP et diverses biomolécules découpées en billes selon leurs paramètres d'interaction	162

ABREVIATIONS

ADNe : acide désoxyribonucléique extracellulaire

AHL : acylhomoserine lactones

AIP : *autoinducing peptide*

AMP : peptides antimicrobiens

ARN : acide ribonucléique

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

BHI : *Brain Heart Infusion*

CMB : concentration minimale bactéricide

CMEB : concentration minimale éradicatrice d'un biofilm

CMI : concentration minimale inhibitrice

CM Ib : concentration minimale inhibitrice d'un biofilm

CLR : clarithromycine

DMPG : dimiristoylphosphatidylglycerol

DO : densité optique

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

E. coli : *Escherichia coli*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

FDA : *Food and Drug Administration*

Glc : glucose

GMP : guanosine monophosphate

H. influenzae : *Haemophilus influenzae*

HPLC : chromatographie liquide à haute pression

IP : indice de polydispersité

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

LPS : lipopolysaccharide

LVX : levofloxacin

MSCRAMM : *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule*

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NP : nanoparticules

NP-CLR : nanoparticules chargées en clarithromycine

NP-Dy650 : nanoparticules chargées en Dy650

NP-Dy650-PLL : nanoparticules chargées en Dy650 et adsorbant de la PLL en surface

NP-LVX : nanoparticules chargées en levofloxacin

NP-PLL : nanoparticules adsorbant de la PLL en surface

NP-RIF : nanoparticules chargées en rifampicine

NP-RIF-PLL : nanoparticules chargées en rifampicine et adsorbant de la PLL en surface

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PBS : *phosphate buffer saline*

PD : pharmacodynamie

PEG : polyéthylène glycol

PIA : *polysaccharide intercellular adhesin*

PK : pharmacocinétique

PLA : acide poly-lactique

PLGA : acide poly-lactique co-glycolique

PLH : poly-L-histidine

PLL : poly-L-lysine

PNAG : poly N-acetyl glucosamine

RIF : rifampicine

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

S. gordonii : *Streptococcus gordonii*

S. mutans : *Streptococcus mutans*

S. oralis : *Streptococcus oralis*

UFC : unités formant des colonies

PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS

Publications

Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic delivery in *Staphylococcus aureus* biofilms

D. Da Costa, C. Exbrayat-Héritier, B. Rambaud, S. Megy, R. Terreux, B. Verrier, C. Primard

J. Nanobiotechnol.

Article en cours de révision (**Résultats 2.1**)

Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering

M. Bekhouche, M. Bolon, F. Charriaud, M. Lamrayah, D. Da Costa, C. Primard, A. Costantini, M. Padeloup, S. Gobert, F. Mallein-Gerin, B. Verrier, M. Ducret and J-C. Farges

J. Mater. Chem. B. 2020

Article publié (**Annexe 1**)

Molecular dynamics studies of poly (lactic acid) nanoparticles and their interactions with vitamin E and TLR agonists Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄

S. Megy, S. Agüero, D. Da Costa, M. Lamrayah, M. Berthet, C. Primard, B. Verrier and R. Terreux

Nanomaterials 2020

Article publié (**Annexe 2**)

Communications orales

Innovative i-Particles®-based combination therapy for biofilm-associated *S. aureus* infections

3^{ème} Congrès BIOMAT, La Grande Motte, juin 2019

Présentation en anglais

Potentiating an antibiotherapy by a multi-functionalized vector adapted for biofilm infections

9^e Colloque Réseau National Biofilm, Nancy, décembre 2019

Présentation en français

Posters

i-Particles[®], a safe-by-design drug delivery technology

D. Da Costa, B. Verrier, C. Primard

Congrès C’Nano, Lyon, décembre 2017

Potentiating an antibiotherapy by a multi-functionalized vector adapted for biofilm infections

D. Da Costa, B. Rambaud, B. Verrier, C. Primard

Journée de l’EDISS, Lyon, octobre 2019

Potentiating an antibiotherapy by a multi-functionalized vector adapted for biofilm infections

D. Da Costa, B. Rambaud, B. Verrier, C. Primard

Immunotherapies for Infectious Diseases Congress, Lyon, décembre 2019

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES BIOFILMS BACTERIENS

2. LES THERAPIES ANTI-BIOFILMS

3. LES SYSTEMES DE DELIVRANCE D'ANTIBIOTIQUES

4. PROJET ET OBJECTIFS

1. LES BIOFILMS BACTERIENS

1.1. Historique

Alors que les infections bactériennes ont entraîné des centaines de milliers de morts au cours de l'Histoire, l'âge d'or de la microbiologie initié par Louis Pasteur et Robert Koch à la fin du XIX^{ème} siècle a révolutionné le monde moderne. Leurs découvertes, conduisant au développement de traitements antibiotiques et de procédures d'hygiène, ont permis de réduire les ravages causés par ces épidémies et d'améliorer considérablement la qualité de vie à travers le monde¹. Mais depuis quelques décennies, les infections chroniques souvent difficiles à éradiquer, ainsi que l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques ont plongé la société dans une nouvelle ère où les microbes peuvent avoir le dernier mot².

Pour comprendre ce phénomène, il faut reprendre les différentes découvertes scientifiques de ces derniers siècles. Antoni van Leeuwenhoek (Pays-Bas, 1632-1723), aujourd'hui considéré comme le père de la microbiologie, est le premier à décrire des bactéries qu'il a observées sur des prélèvements de sa bouche. C'est son travail remarquable sur les lentilles de microscopes qu'il a lui-même développées qui lui a permis d'atteindre une résolution optique inégalée à son époque et d'observer ainsi des protistes et des bactéries. Il publiera officiellement ses découvertes en 1677 dans une lettre adressée à la Royal Society, la plus ancienne Académie des sciences en Europe, fondée en 1660 à Londres³. Alors qu'il y décrit des bactéries sous forme agrégée, c'est le mode de vie planctonique des bactéries qui sera retenu dans les siècles suivants. A partir de la fin du XIX^{ème} siècle, les découvertes et travaux menés par Louis Pasteur (France, 1822-1895) et Robert Koch (Allemagne, 1843-1910) ont permis de confirmer la théorie microbienne, suggérant que de nombreuses maladies sont causées par des micro-organismes. Le microbiologiste allemand recevra d'ailleurs le prix Nobel de médecine en 1905 pour avoir, entre autres, démontré que la tuberculose était causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*, qu'il avait isolé et cultivé en 1882.

L'ensemble de ces travaux sont à l'origine de révolutions scientifiques en microbiologie, conduisant à la découverte des antibiotiques et des vaccins ainsi qu'à la mise en place de procédures d'hygiène et de stérilité. Etudiant les propriétés antibactériennes de certains colorants chez Bayer, Gerhard Domagk (Allemagne, 1895-1964) a découvert en 1931 que la sulfamidochrysoïdine permettait de traiter les infections systémiques à *Streptococcus pyogenes* sur des modèles de rat⁴. Commercialisé en 1935 sous le nom de Prontosil® par la firme Bayer, ce premier antibiotique de la famille des sulfonamides sera remplacé par la pénicilline quelques années plus tard. Découverte par Alexander Fleming (Ecosse, 1881-1955) en 1928 et utilisée chez l'humain à partir de 1942, elle présentait l'avantage d'être efficace

sur un spectre bactérien plus large. Marquant le début de l'âge d'or de la découverte des antibiotiques et une révolution médicale mondiale, l'espérance de vie aux Etats-Unis est alors passée de 58,5 ans à 68,6 ans en l'espace de 16 ans, entre 1936 et 1952, selon les données statistiques officielles publiées par le gouvernement américain⁵. L'évolution de la mortalité due aux maladies infectieuses aux Etats-Unis durant le XX^{ème} siècle concorde avec ces chiffres, diminuant de 8,2% par an en moyenne entre 1938 et 1952⁶. Particulièrement, la mortalité annuelle associée aux infections bactériennes telles que la tuberculose, la fièvre typhoïde ou la diphtérie est passée à elle seule de 277 000 à 93 000 américains sur cette même période⁵.

La grande efficacité des traitements antibiotiques dans la lutte contre les infections de bactéries alors considérées comme étant planctoniques, dissimulait cependant l'échec de traitements vis-à-vis de certaines infections bactériennes dites persistantes². Entre 1952 et 2002 soit sur une période de 50 ans, l'espérance de vie des américains a alors augmenté de « seulement » 10 années supplémentaires, le taux de mortalité a baissé de 2,3% par an en moyenne, et le nombre de morts annuel a augmenté et est passé à 110 000, marquant un ralentissement de l'amélioration des conditions de vie par rapport aux années 1940⁵. Les premiers rapports relatant l'apparition de résistances bactériennes aux traitements antibiotiques proviennent du japonais Kitamoto en 1955 suite à une épidémie de dysenterie causée par la bactérie *Shigella dysenteriae*⁷. Alors qu'il mettait en évidence l'apparition rapide de résistances entre bactéries et la capacité de les transférer à des bactéries sensibles, il a fallu plus de 10 ans et d'autres travaux de recherche pour que la communauté scientifique mondiale l'admette. Suite à des études menées par une équipe américaine en 1966, la résistance bactérienne a finalement été définie comme responsable de l'échec des traitements antibiotiques dans certaines infections, mais la connaissance sur la récalcitrance bactérienne aux antibiotiques n'en était qu'à son début².

Dans les années 1930, le terme de film a été défini en microbiologie marine pour distinguer les bactéries planctoniques, isolées et mobiles, des bactéries agrégées et adhérentes aux parois de bateaux, observées lors de phénomènes d'encrassement biologique par Henrici et Zobell⁸. Jouant un véritable rôle d'adaptation aux contraintes environnementales pour lutter contre les agressions externes, une privation en nutriments ou un stress, ce mode de vie est également adopté par d'autres micro-organismes comme les champignons et les levures⁹. Ce n'est qu'en 1970 que Niels Høiby est le premier à décrire le lien entre une infection pulmonaire persistante et des agrégats de *Pseudomonas aeruginosa* entourés d'une substance collante (appelée *slime*), grâce à des examens de poumons de patients atteints de mucoviscidose par microscopie (Figure 1)¹⁰. A la fin des années 1970, John William Costerton, alors professeur et chercheur en microbiologie environnementale à l'Université de Calgary au Canada, deviendra le pionnier dans les études et caractérisations de

ce qu'il appellera des biofilms au début des années 1980¹¹. Le biofilm est alors défini comme une communauté bactérienne comprenant une ou plusieurs espèces différentes capables d'adhérer à une surface et protégées dans une matrice extracellulaire auto-sécrétée¹². Il est alors identifié comme responsable de la récalcitrance bactérienne aux traitements antibiotiques dans le cadre des infections persistantes.

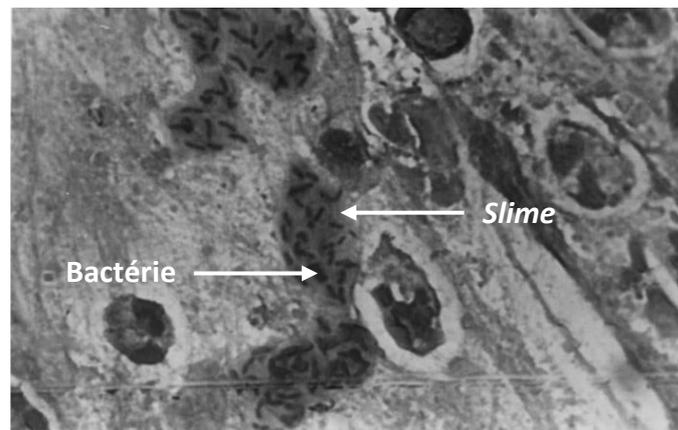


Figure 1. Première image de biofilm bactérien observé sur des expectorations de patients atteints de mucoviscidose par microscopie optique, montrant des agrégats de bactéries entourés de *slime* (adapté d'Høiby *et al.*¹⁰)

Depuis, les études biologiques et médicales autour de ce mode de vie croissent de manière exponentielle, comme en atteste l'évolution du nombre de publications sur les biofilms disponibles sur PubMed, passant de 3 en 1981 à environ 56 000 en 2020 (Figure 2).

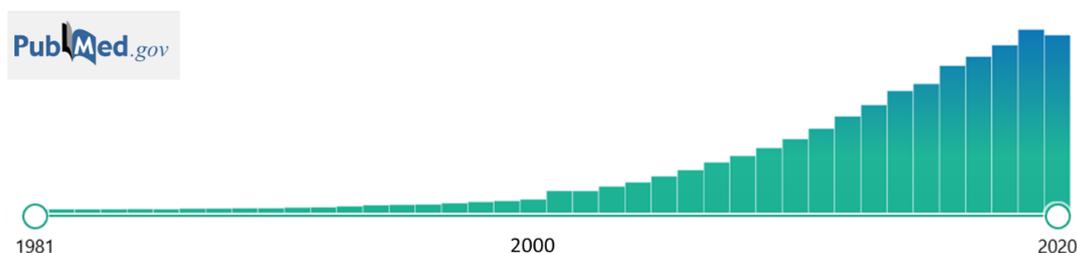


Figure 2. Résultats de l'évolution du nombre de publications associées au terme « biofilm » sur PubMed (au 09/11/2020)

Relativement récente par rapport à la découverte des bactéries, la caractérisation de ce mode de vie et des mécanismes sous-jacents permet de comprendre l'échec des antibiothérapies conventionnelles développées dans les années 1940 et dirigées contre les bactéries planctoniques. Ce décalage temporel permet également d'expliquer qu'il n'y ait, à l'heure actuelle, qu'un seul traitement disponible cliniquement (Arikayce® d'Insméd) ayant prouvé son efficacité contre des biofilms (Figure 3).

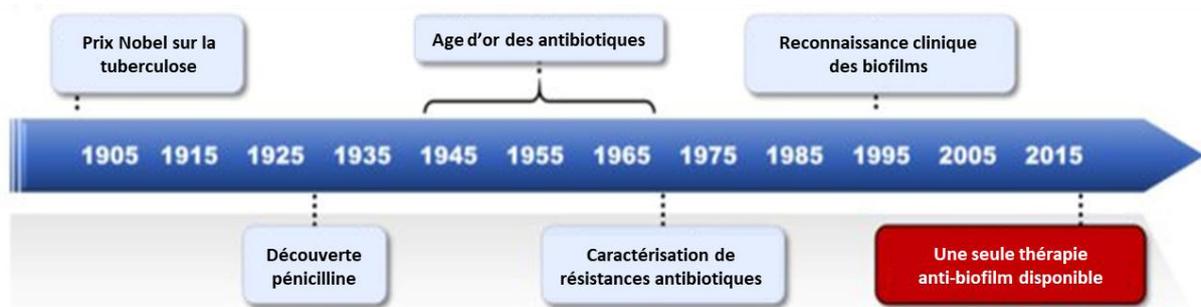


Figure 3. *Timeline* de la caractérisation clinique et pathologique des bactéries à celle du mode de vie en biofilms, et conséquences sur les thérapies antibactériennes (adapté de Garrison *et al.*¹³)

1.2. Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe au cours duquel les bactéries passent d'un mode de vie planctonique à sessile¹⁴. Il peut se résumer en 4 étapes principales : l'adhésion des bactéries à une surface, suivie de la formation de micro-colonies, la maturation et la dispersion du biofilm néoformé (Figure 4)¹⁵.

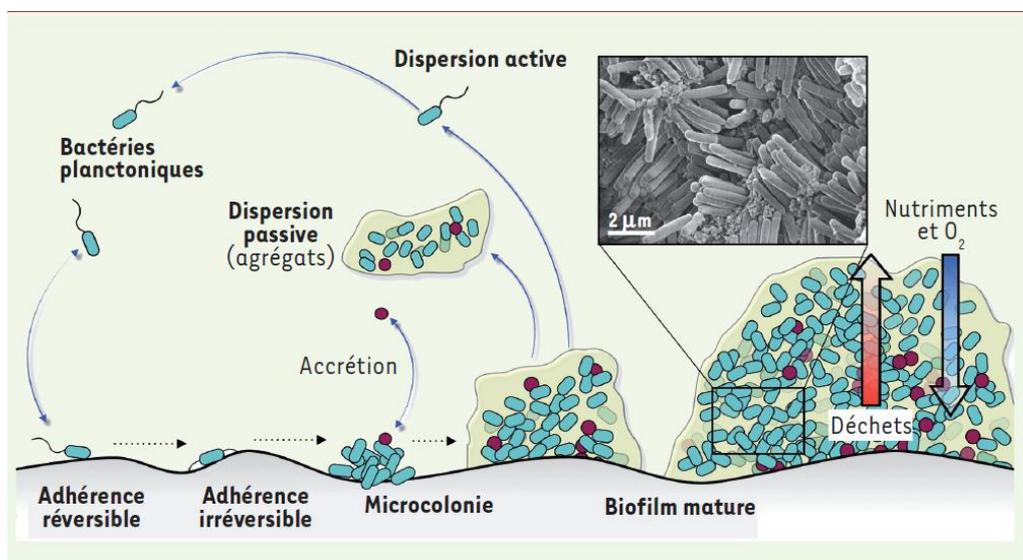


Figure 4. Etapes de formation d'un biofilm (d'après Lebeaux et Ghigo¹⁵)

1.2.1. Adhésion des bactéries à une surface

Les bactéries planctoniques sont susceptibles d'adhérer à une surface dès lors qu'elles sont assez proches de celle-ci. Leur capacité d'adhésion est d'abord régie par un processus réversible mettant en jeu plusieurs forces d'interactions faibles en fonction de la composition

de la surface bactérienne et de la surface d'adhésion qui peut être abiotique comme un dispositif médical, ou biotique comme une couche de cellules¹⁶. La surface chargée négativement des bactéries Gram négatif et Gram positif favorise leur adhérence sur des surfaces cationiques mais elles peuvent également former des biofilms sur des surfaces anioniques malgré une adhésion initiale moins favorable¹⁷. D'autres forces non spécifiques comme des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et des forces de Van der Waals permettent notamment de surmonter les répulsions électrostatiques et d'aboutir à une forte adhésion des bactéries à la plupart des supports qu'elles rencontrent ainsi qu'entre elles^{18,19}.

Une fois cette barrière énergétique franchie, les bactéries sont capables d'adhérer à une surface à l'aide de processus de haute affinité. Des molécules présentes en surface des bactéries Gram négatif et Gram positif sont capables de reconnaître et lier de manière covalente ou non-covalente des protéines humaines de la matrice telles que les fibronectines, les vitronectines ou les fibrinogènes²⁰. Elles se nomment les MSCRAMMs pour *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* et on en dénombre une vingtaine à la surface de *Staphylococcus aureus*²¹. Par exemple, le *Clumping factor A* interagit avec le fibrinogène, la *Cell wall-associated fibronectin binding protein* s'associe avec la fibronectine, la *Collagen adhesin* est capable de se fixer au collagène, ou encore l'*Elastin binding protein* se lie à l'élastine²². Des autolysines telles qu'AtlE chez *Staphylococcus epidermidis* peuvent également médier l'adhésion bactérienne en se liant aux protéines de la matrice humaine ou divers supports abiotiques comme le polystyrène^{21,23}. Chez les bactéries Gram négatif, les adhésines sont retrouvées à la surface de leurs *pili* ou *fimbriae*, comme par exemple FimH chez *E. coli* ou MrkD chez *Klebsiella pneumoniae*^{24,25}. Des macromolécules présentes dans la matrice extracellulaire des biofilms renforcent également l'adhésion à une surface ainsi que dans la cohésion mécanique entre bactéries telles que des protéines amyloïdes, l'ADN extracellulaire ou des polysaccharides comme la *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA)^{26,27}. L'ensemble de ces phénomènes complexes permet une adhésion forte et irréversible entre les bactéries et la surface, posant la base pour la formation du biofilm à proprement dit.

1.2.2. Formation de micro-colonies

Une fois que les bactéries ont adhéré à un support et que la première couche de cellules est établie, ces dernières prolifèrent en adoptant une structure dite en « champignon » ou en « tour » (Figure 5)²⁸. Ce processus mène à la formation de micro-colonies qui peuvent abriter une ou plusieurs espèces bactériennes.

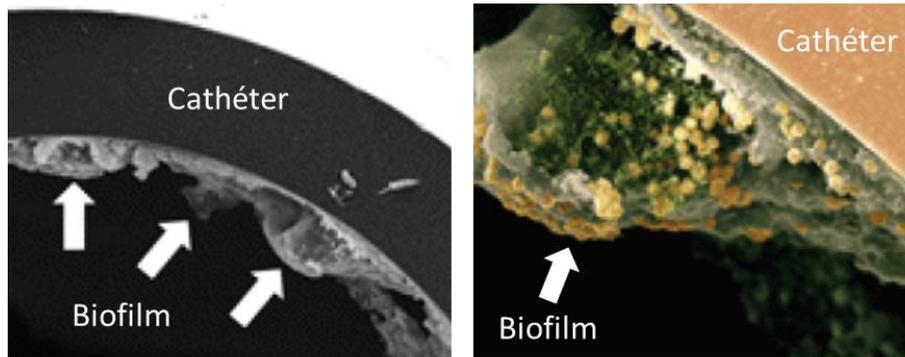


Figure 5. Structure en « champignon » de biofilms de *S. aureus* adhérents à un cathéter, observée au microscope électronique à balayage et pseudo-colorée (bactéries en jaune et matrice en vert) (adapté de Rabin *et al.*²⁸)

Les bactéries détectent des stimuli externes et communiquent entre elles à travers un système de signalisation chimique complexe appelé *quorum sensing*. Il a été découvert pour la première fois chez *Aliivibrio fischeri* par Kaplan et Greenberg en 1985²⁹. Il s'agit d'une bactérie marine vivant en symbiose avec certains céphalopodes et devenant bioluminescente lorsqu'elle se développe sous forme de biofilms par surexpression de luciférase, induite après détection de concentrations élevées d'auto-inducteurs, molécules impliquées dans le *quorum sensing*. Chez les bactéries Gram négatif, ces molécules sont des acylhomoserine lactones (AHLs) capables de pénétrer la membrane bactérienne et synchroniser l'expression de gènes spécifiques à travers l'opéron *lux* chez *Aliivibrio fischeri* ou *las* chez *Pseudomonas aeruginosa* par exemple (Figure 6)³⁰. Chez les bactéries Gram positif, il s'agit de polypeptides comme l'*autoinducing peptide* (AIP) chez *S. aureus* capable de lier un récepteur membranaire et d'induire une cascade enzymatique responsable de l'expression de gènes spécifiques au développement du biofilm et formant une boucle de rétroaction positive.

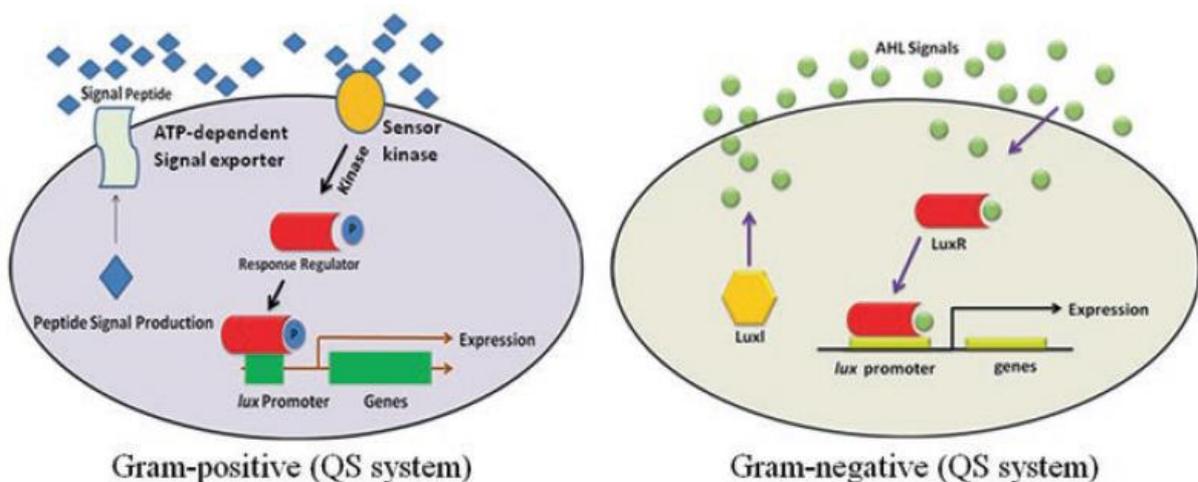


Figure 6. Systèmes de *quorum sensing* chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (d'après Ganesh et Rai³⁰)

La sécrétion de ces composés solubles restreint la communication à des zones physiquement proches, surtout lorsqu'une concentration seuil est requise pour l'activité, car ces composés sont alors rapidement dilués dans l'environnement ou dégradés par des enzymes. Un mode de sécrétion basé sur des vésicules membranaires, produites au niveau de la membrane externe ou interne d'une bactérie Gram négatif ou du cytoplasme d'une bactérie Gram positif et d'une taille variant de 20 à 400 nm, permet d'atteindre des cibles distantes^{31,32}. Grâce à ces transporteurs qui peuvent s'intégrer dans la membrane d'une autre bactérie, différents plasmides, acides nucléiques, nutriments, facteurs de virulence et composants de résistance aux antibiotiques peuvent être délivrés de façon ciblée à de fortes concentrations et protégés des dégradations par une membrane lipidique (se référer au § 1.3.2.4 pour plus de détails)³¹. Les molécules hydrophobes du *quorum sensing* sont également transportées *via* ces vésicules dans des environnements aqueux, notamment la molécule signal PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) produite par *P. aeruginosa*, qui induit elle-même la formation des vésicules et permet sa dissémination³².

Les micro-colonies du biofilm se développent alors de manière syntrophique, structurée et coordonnée par synchronisation de la régulation de gènes, favorisant la colonisation de l'hôte ainsi que leur défense face aux perturbations environnantes³³.

1.2.3. Maturation du biofilm

A ce stade de développement du biofilm, les bactéries sécrètent les substances polymériques constitutives de la matrice protectrice, telles que des protéines, lipides, polysaccharides et ADN, dont les types et les fonctions sont détaillés en § 1.3.2. Des canaux d'eau se forment alors au sein du biofilm permettant d'assurer la circulation et la distribution de nutriments, substrats et oxygène dans le biofilm, mais aussi l'excrétion de produits et déchets métaboliques hors du biofilm (Figure 7)³⁴.

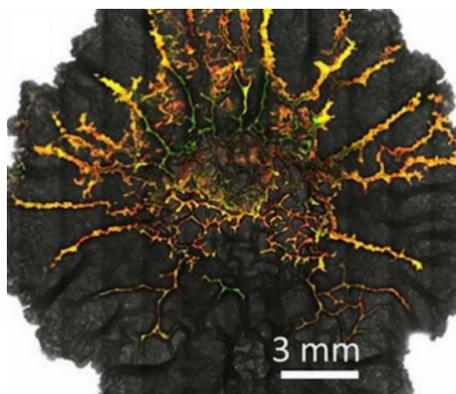


Figure 7. Image de microscopie confocale d'un biofilm de *Bacillus subtilis* observé après injection d'une solution aqueuse contenant des billes de fluorophores et révélant l'architecture des canaux d'eau (d'après Wilking *et al.*³⁴)

Une architecture en 3 dimensions est alors mise en place où la présence de gradients de nutriments et d'oxygène en fonction de la profondeur dans le biofilm et de la distance des bactéries aux canaux d'eau forme un environnement hétérogène, avec des bactéries organisées suivant leur métabolisme et leur type énergétique²⁸. Une fois mature, le biofilm est régi par un équilibre dynamique et vont se suivre des cycles successifs d'accumulation et de perte de biomasse³⁵. En interaction constante avec son environnement, certains facteurs vont en effet influencer le devenir du biofilm.

1.2.4. Dispersion du biofilm

Des forces mécaniques liées à des flux de l'organisme peuvent induire la dispersion passive du biofilm, mais la surpopulation au sein d'un biofilm, le manque de nutriments ou tout autre stress sont également des facteurs entraînant le détachement actif des bactéries^{36,37}. A travers des cascades de signalisation bactériennes, différentes enzymes sont alors produites et sécrétées dans la matrice, favorisant sa dégradation³⁸. Par exemple, il a été démontré qu'une thermonucléase sécrétée par *S. aureus* était capable de dégrader l'ADN extracellulaire présent dans la matrice du biofilm et assurant sa cohésion³⁹. D'autres enzymes telles que l'alginate lyase sécrétée par *P. aeruginosa*, la Dispersin B chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ou encore la hyaluronidase chez *Streptococcus intermedius* ont démontré leur capacité à entraîner la dispersion des biofilms⁴⁰⁻⁴².

D'autres mécanismes complexes sont impliqués dans la dispersion d'un biofilm. Il a par exemple été démontré chez *P. aeruginosa* que des rhamnolipides, surfactants extracellulaires, induisaient le détachement de biofilms⁴³. Chez les staphylocoques, le *quorum sensing* médié par le locus *agr* est responsable de la régulation de l'expression de petits peptides appelés *phenol soluble modulins* (PSMs). Ces PSMs possèdent d'importants rôles tout au long du processus de formation d'un biofilm staphylococcique et agissent comme agent surfactant dans la dispersion de ce dernier^{44,45}. Enfin, la surexpression des protéines associées à la formation de flagelles, organelles responsables de la mobilité des bactéries, est également un facteur déterminant dans la dispersion du biofilm⁴⁶. Elle permet alors de coloniser un autre site et répandre l'infection, formant ainsi un véritable cycle de vie.

1.3. Structure et composition d'un biofilm

D'une taille pouvant varier de 5 à 200 µm de diamètre pour la plupart des biofilms cliniques en fonction de la pathologie associée, ceux-ci peuvent atteindre jusqu'à 1 cm² sur des modèles de laboratoire en microplaque comme en atteste la Figure 7⁴⁷. Les canaux d'eau et pores présents dans la structure complexe du biofilm peuvent avoir une taille d'environ 3

μm de diamètre dans les zones les plus superficielles d'un biofilm et sont réduits à $0,3 \mu\text{m}$ dans les zones les plus profondes⁴⁸. Les biofilms sont d'une composition extrêmement variée, comprenant une ou plusieurs souches bactériennes, ainsi qu'une matrice constituée d'un grand nombre de polymères qui confèrent les attributs uniques du mode de vie et de la virulence des biofilms⁴⁹.

1.3.1. Bactéries Gram négatif et Gram positif

Les biofilms sont constitués d'une ou plusieurs espèces bactériennes organisées en paquets cellulaires denses et comptant pour moins de 10% de la masse d'un biofilm²⁶. D'une taille d'environ $1 \mu\text{m}$, ces bactéries ont une paroi à Gram négatif ou positif (Figure 8).

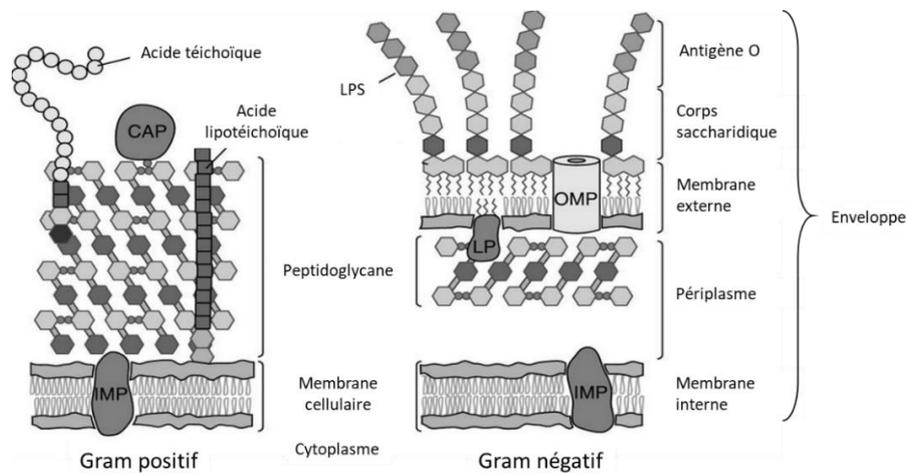


Figure 8. Structure des enveloppes bactériennes à Gram négatif et à Gram positif (adapté de Silhavy et *al.*⁵⁰)

Les bactéries qui possèdent une paroi à Gram négatif regroupent les bactéries du genre *Pseudomonas* tel que *P. aeruginosa*, *Escherichia* tel que *E. coli* ou encore *Salmonella*. Cette paroi se caractérise par une membrane interne entourant le cytoplasme de la bactérie, et constituée d'une bicouche phospholipidique particulièrement riche en phosphatidylethanolamine (PE) et phosphatidylglycerol (PG) chez *E. coli* par exemple. Les bactéries ne présentent pas d'organites intracellulaires responsable de multiples fonctions vitales pour la cellule, en revanche la membrane interne bactérienne est riche en protéines membranaires (IMP pour *intern membrane protein*) qui jouent un rôle dans la production d'énergie ou la synthèse et la sécrétion de macromolécules par exemple⁵⁰. Le périplaste délimitant l'espace aqueux entre la membrane interne et la membrane externe, est riche en protéines comme les protéines de liaison du périplaste impliquées dans le transport d'acides aminés et de sucres ou des protéines chaperons impliquées dans la biogénèse de l'enveloppe⁵⁰. Une fine couche de peptidoglycane est présente dans le périplaste, exosquelette rigide constitué d'unités répétées d'un disaccharide, l'acide N-acetyl-

glucosamine-N-acetyl-muramique, lié par les chaînes latérales d'un pentapeptide et conférant la forme de la bactérie. La membrane externe est une bicouche de glycolipides, dans laquelle sont enchâssées des protéines de transport (OMP pour *outer membrane protein*) responsables notamment de la sécrétion des substances polymériques de la matrice d'un biofilm. Elle est recouverte par une couche de lipopolysaccharides (LPS), endotoxine notamment reconnue par le *Toll Like Receptor 4* (TLR4) des macrophages du système immunitaire à travers son antigène O⁵⁰. La charge de surface de ce type de bactérie est globalement négative⁵¹.

Chez les bactéries possédant une paroi à Gram positif, on retrouve le genre *Staphylococcus* comme *S. aureus*, *Enterococcus* tel qu'*E. faecalis*, *Bacillus* avec *B. subtilis* ou encore *Streptococcus*. Elles ne possèdent pas de membrane externe contrairement aux parois à Gram négatif, mais sont constituées d'une couche de peptidoglycane plus épaisse⁵⁰. Implantée au travers de cette couche, de nombreux acides téichoïques et acides lipotéichoïques, longs polymères anioniques, confèrent une charge de surface globale négative à la bactérie⁵¹. De plus, une variété de protéines est présente en surface (CAP pour *covalently attached protein*). Il s'agit de protéines similaires à celles présentes dans le périplasme des bactéries Gram négatif mais également d'adhésines.

1.3.2. Composants de la matrice et leurs rôles

L'autre constituant majeur du biofilm est la matrice, sécrétée par les bactéries elles-mêmes et composée d'eau (jusqu'à 97% en masse de la matrice) et de diverses substances polymériques telles que des exopolysaccharides (1-2%), des protéines et enzymes (1-2%), de l'ADN et de l'ARN (< 1%) ou encore des lipides (< 1%) (Figure 9)⁵². L'ensemble des constituants de la matrice, par rapport aux bactéries, représentent 90% de la masse totale d'un biofilm²⁶.

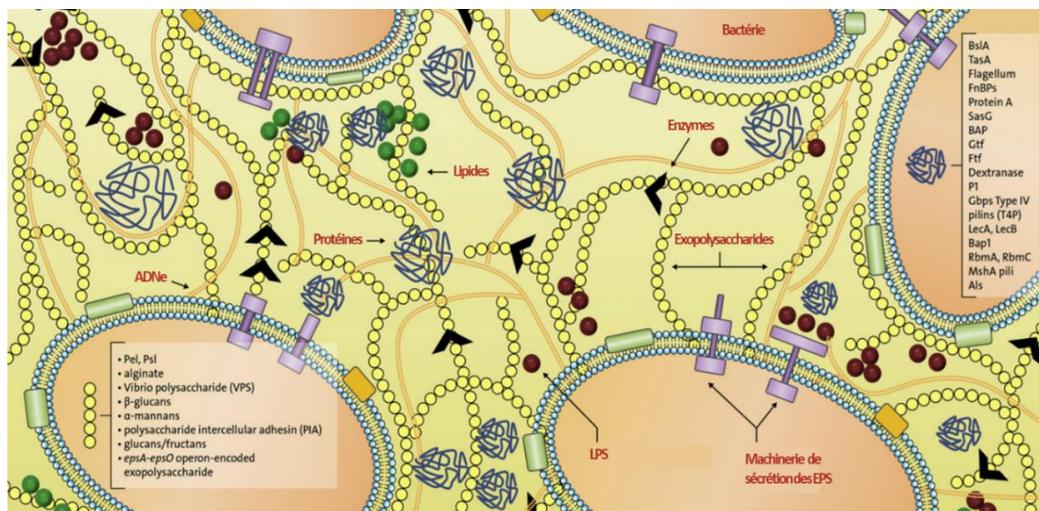


Figure 9. Schéma de la composition et structure d'un biofilm (adapté de Karygianni et al.⁴⁹)

Plusieurs paramètres influent sur la structure et la composition du biofilm tels que les bactéries à l'origine de ce biofilm, les différentes forces exercées sur la matrice du biofilm, la température ou encore les nutriments disponibles²⁶. En résultent des biofilms plus ou moins durs, plats, filamenteux et poreux. La matrice structure le biofilm en trois dimensions et les éléments la composant sont également responsable de diverses fonctions décrites ci-dessous.

1.3.2.1. Exopolysaccharides

Initialement regroupé sous l'acronyme EPS pour *ExoPolySaccharides*, l'ensemble des constituants de la matrice fut finalement renommé *Extracellular Polymeric Substances*, en conservant cet acronyme, après avoir découvert la présence d'autres macromolécules dans la matrice²⁷. Il n'en reste pas moins que les exopolysaccharides constituent le polymère majoritaire de la matrice. Ils diffèrent en fonction de la souche bactérienne et sont impliqués tout au long du cycle de vie du biofilm avec des fonctions diverses²⁸.

Longues molécules linéaires ou ramifiées, les exopolysaccharides constituent un réseau stable, dense et complexe au cœur de la matrice, véritable échafaudage sur lequel les autres composants peuvent s'attacher (Figure 9). La structure est stabilisée par des interactions faibles intra ou inter-moléculaires qui favorisent des rapprochements moléculaires à travers des interactions de Van des Waals, des liaisons hydrogènes ou des forces électrostatiques. De plus, des répulsions électrostatiques inter-molécules empêchent l'effondrement du biofilm sur lui-même²⁶. Des polysaccharides de la matrice peuvent interagir avec les lectines, protéines retrouvées à la surface membranaire des bactéries. Ils font ainsi le lien entre les constituants de la matrice et les bactéries, et assurent la cohésion du biofilm en stabilisant le réseau matriciel régi par les exopolysaccharides²⁶. Notamment, LecA et LecB retrouvées chez *P. aeruginosa* se lient spécifiquement aux résidus galactose et fucose respectivement. Il a été démontré que l'inhibition de LecB par liaison avec un ligand dendrimérique de type fucosyl-peptide menait à l'inhibition complète de la formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* ainsi qu'à la dispersion totale d'un biofilm établi⁵³.

Les exopolysaccharides Pel, un polysaccharide riche en glucose, ainsi que Psl, basé sur des séquences répétées d'un pentasaccharide constitué de mannose, glucose et rhamnose, et l'alginate, un polysaccharide anionique d'acide guluronique et d'acide mannuronique, sont les trois principaux sucres retrouvés dans la matrice de *P. aeruginosa*⁴⁹. Pel et Psl jouent un rôle essentiel dans les premières phases de formation du biofilm favorisant l'adhésion bactérienne, mais également dans la protection contre les antibiotiques. L'alginate serait un facteur de virulence important dans l'infection par *P. aeruginosa* en protégeant de l'action de certains antibiotiques tels que la ciprofloxacine et certains bêta-lactamines par séquestration

comme le suggèrent Hodges et Gordon⁵⁴. Elle protège également les bactéries des mécanismes du système immunitaire régis par la phagocytose des macrophages grâce à la viscosité qu'elle engendre dans la matrice du biofilm⁵⁵.

Chez les staphylocoques et notamment *S. aureus*, l'exopolysaccharide principal est la *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA). Aussi appelée poly N-acetyl glucosamine (PNAG), sa synthèse et son excrétion sont réalisées par quatre protéines IcaA, IcaB, IcaC et IcaD²⁸. Elle joue un rôle essentiel dans les interactions et la cohésion entre bactéries staphylococciques, et l'expression de l'opéron *icaADBC* est directement corrélée à la production de biofilms staphylococciques⁵⁶. Des homologues de PIA ont également été étudiés dans d'autres souches bactériennes formant des biofilms comme le poly-bêta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA) chez *E. coli* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*^{21,57}.

1.3.2.2. Protéines extracellulaires

Les protéines présentes dans la matrice sont retrouvées en proportions massiques relativement importantes et similaires à celles retrouvées pour les exopolysaccharides. Elles se classent en deux groupes fonctionnels : les protéines non enzymatiques et les enzymes, et sont impliquées dans toutes les étapes de formation d'un biofilm.

Parmi les protéines non enzymatiques, une famille de protéines appelée bap pour *biofilm-associated proteins* est retrouvée chez différentes souches bactériennes comme *E. faecalis* qui synthétise l'*Enterococcal surface protein* ou *S. aureus* synthétisant Bap²⁶. Il s'agit de protéines membranaires impliquées dans l'adhésion bactérienne. Dans une étude *in vivo* menée par Cucarella *et al.*, des isolats de *S. aureus* Bap-positifs ont colonisé et persisté sur des glandes mammaires bovines de manière significativement plus élevée par rapport à des souches Bap-négatives⁵⁸. De plus, l'inhibition de l'opéron *ica* (précédemment décrit en § 1.3.2.1) n'a pas d'impact sur la capacité à former des biofilms de *S. aureus* Bap-positifs *in vitro*, suggérant que Bap peut compenser la déficience en PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*)⁵⁸.

La protéine amyloïde TasA, constituant majeur de la matrice de *B. subtilis*, est responsable de l'intégrité structurelle des biofilms⁵⁹. Elle forme des fibres servant de soutien aux bactéries et assurant ainsi un rôle structurel indispensable au développement et à l'accroissement du biofilm. De façon similaire, les *glucan-binding proteins* (Gbps) sont des protéines synthétisées par *Streptococcus mutans* et capables de se lier aux glucanes, polymères de glucose, assurant ainsi le maintien de l'architecture structurelle du biofilm⁶⁰. Il a été démontré que des mutants KO en Gbps produisaient des biofilms significativement moins épais que les souches sauvages⁶⁰. La bêta-toxine est un facteur de virulence sécrété par

S. aureus, possédant des activités de ligase et de sphingomyelinase (hydrolyse impliquée dans le métabolisme des sphingolipides). A l'université du Minnesota, Huseby *et al.* ont démontré par électrophorèse que cette protéine multifonctionnelle était capable, en présence d'ADN extracellulaire, de s'auto-assembler et de se lier à l'ADN, suggérant la formation d'un réseau matriciel dense de nucléoprotéines dans les biofilms de *S. aureus*⁶¹. Sur un modèle de lapin, l'utilisation de mutants KO de l'expression du gène *hly* codant pour la bêta-toxine a induit une diminution de la production de biofilms, confirmant le rôle de cette protéine dans le développement des biofilms⁶¹.

La protéine SpA à la surface de *S. aureus* possède une double fonction, aussi bien impliquée dans la formation du biofilm que dans sa virulence. En effet, l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-SpA a induit l'inhibition de façon dose-dépendante et jusqu'à inhibition complète de la formation des biofilms d'après une étude *in vitro* menée par Merino *et al.*⁶². De plus, l'ajout de protéine SpA exogène dans le milieu de culture a induit le développement des biofilms, suggérant que cette protéine ne doit pas nécessairement être liée à la surface des bactéries mais peut agir sous forme libre dans la matrice. Cette protéine joue également un rôle important dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte. Ainsi, en se liant au fragment Fc d'immunoglobulines IgG, elle limite la capacité des anticorps à se fixer aux récepteurs Fc des phagocytes, conférant ainsi une activité anti-phagocytaire à *S. aureus*⁶³.

Au niveau des enzymes retrouvées dans la matrice d'un biofilm, la plupart d'entre elles sont impliquées dans la dégradation de celle-ci, à travers l'hydrolyse de l'ensemble des macromolécules la constituant²⁸. Le rôle de cette dégradation est double. D'une part, il permet de fournir une source d'énergie aux bactéries. D'autre part, il permet d'initier la dispersion des bactéries vers d'autres sites. Une étude menée par Kaplan *et al.* a par exemple démontré qu'une β -N-acetylglucosaminidase codée par le gène *DspB* était capable d'induire la dispersion de biofilms de *Actinobacillus actinomycetemcomitans in vitro* par hydrolyse des polymères de N-acetylglucosamine⁴². Dans une autre étude *in vitro*, l'utilisation de hyaluronidase, enzyme possédant une activité de dégradation du hyaluronane, engendrait la dispersion de biofilms de *Streptococcus intermedius*⁴¹.

1.3.2.3. ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est un composant de la matrice retrouvé dans la plupart des biofilms bactériens. Initialement considéré comme un simple résidu issu de cellules lysées, le rôle fondamental de l'ADNe dans les biofilms a été révélé pour la première fois en 2002 seulement, quand Whitchurch *et al.* à l'université de Queensland en Australie ont évalué *in vitro* l'effet d'un traitement à la DNase I sur des biofilms de *P. aeruginosa*⁶⁴. Pendant 150 min,

ils ont observé une dégradation progressive de biofilms âgés de 12, 36 ou 60h. L'ADNe est impliqué dans de nombreuses fonctions au sein du biofilm, décrites ci-dessous (Figure 10)²⁶.

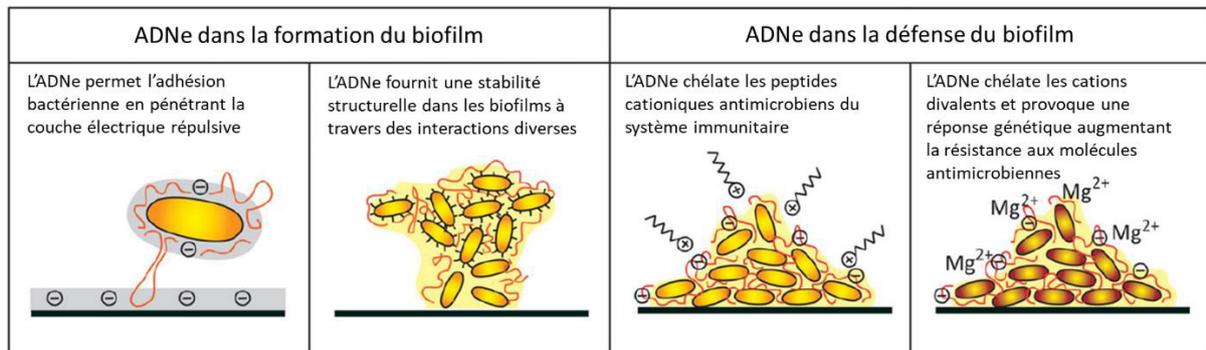


Figure 10. Différentes fonctions de l'ADNe dans les biofilms (adapté d'Okshevsky et Meyer²⁷)

Dès la première étape d'adhésion bactérienne, les forces électrostatiques répulsives présentes entre les bactéries et la surface seraient surmontées grâce à l'ADNe^{65,66}. Il est en effet excrété par les bactéries et se retrouve sous forme libre dans le milieu environnant mais aussi à leur surface sous forme de structures en boucle pouvant s'étendre jusqu'à 400 nm de longueur depuis la surface bactérienne⁶⁷. Cette conformation favoriserait la formation de liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals à longue distance, comme l'a notamment démontré l'équipe du Dr Prashant K. Sharma en utilisant trois souches différentes, *Streptococcus mutans*, *P. aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*⁶⁷. En réduisant ainsi la distance d'interaction avec la surface ou entre les bactéries et en franchissant cette barrière énergétique, l'adhésion est favorisée et peut devenir irréversible par activité des MSCRAMMs²⁷. Lorsque l'ADNe est digéré par de la DNase ajoutée au milieu de culture de bactéries *Staphylococcus xylosus*, leur capacité d'adhésion à une surface en verre est significativement réduite⁶⁸. Cependant, les forces impliquées sont dépendantes de la composition de l'environnement, de la conformation de l'ADNe à la surface des bactéries et de la nature de la surface d'adhésion⁶⁸.

L'ADNe joue un rôle prépondérant dans l'intégrité structurelle d'un biofilm mature²⁷. Mann *et al.* ont mis en évidence son rôle dans la maturation de biofilms de *S. aureus* par l'utilisation de mutants délétaires de l'expression du gène *cid*, impliqué dans la lyse cellulaire et la libération de l'ADNe³⁹. Des interactions électrostatiques avec les autres composants de la matrice permettraient ainsi de maintenir l'architecture structurelle d'un biofilm. Par exemple, la bêta-toxine exprimée par *S. aureus* et précédemment décrite en § 1.3.2.2 s'assemble avec l'ADNe pour former un réseau matriciel dense de nucléoprotéines, véritable squelette de biofilms matures de *S. aureus*⁶¹. De nombreuses études ont notamment

caractérisé l'importance de l'ADNe dans la structuration de divers biofilms matures par un traitement à la DNase^{64,69-71} ou par ajout d'ADN exogène⁷².

En outre, grâce à sa capacité à lier les cations de l'environnement, l'ADNe est impliqué dans les processus de défense des biofilms. Il est par exemple responsable de la séquestration des peptides cationiques antimicrobiens synthétisés par le système immunitaire. Ainsi, sa capacité à lier la bêta-défensine 3 humaine inhibe les propriétés anti-biofilms de ce peptide permettant à *Haemophilus influenzae* de former des biofilms *in vitro*⁷³. Dans une autre étude, la capacité de l'ADNe à chélater des cations divalents tels que Mg²⁺ ou Ca²⁺ qui stabilisent le LPS bactérien, a entraîné l'expression de gènes codant pour une modification structurale du LPS, menant à la résistance bactérienne aux peptides antimicrobiens et à certains antibiotiques cationiques, comme les aminoglycosides, chez *P. aeruginosa*⁷⁴. Il a en revanche été démontré qu'avec des concentrations plus élevées d'ADNe, la chélation des cations stabilisant le LPS a perturbé la surface bactérienne, entraînant la lyse des bactéries *in vitro*⁷⁴. Cette activité antimicrobienne de l'ADNe suggère qu'il pourrait également être impliqué dans des mécanismes de régulation de la viabilité bactérienne.

La proportion d'ADNe présente dans la matrice d'un biofilm constitue également un réservoir pour le transfert horizontal de gènes entre bactéries^{75,76} (Figure 11). Outre le transfert par conjugaison entre deux bactéries impliquant les *pili* et adhésines en surface, par transduction *via* des bactériophages ou faisant intervenir des agents de transfert de gènes⁷⁶, la transformation naturelle permet la prise en charge de fragments d'ADNe libres présents dans la matrice qui sont intégrés dans l'ADN chromosomique de la bactérie ou sont circularisés sous forme de plasmides. Le transfert horizontal de gènes est notamment responsable de la propagation de gènes d'antibiorésistance au sein d'un biofilm, abordée en § 1.5.3.1.

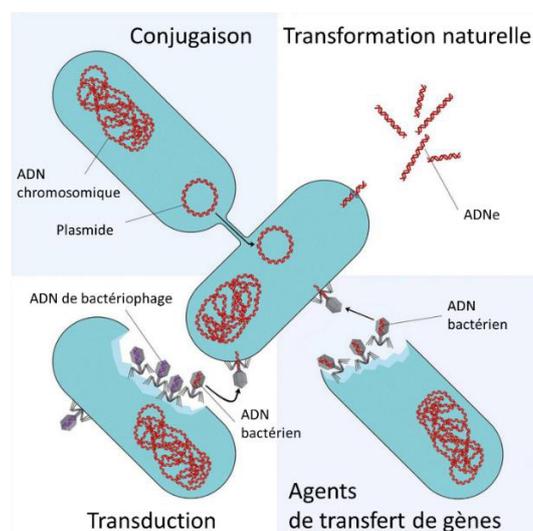


Figure 11. Différents mécanismes de transfert horizontal de gènes chez la bactérie (adapté de von Wintersdorff *et al.*⁷⁶)

L'ensemble des macromolécules présentées dans cette partie jouent donc un rôle actif non seulement dans l'établissement et la croissance des biofilms mais également dans leur protection contre les agressions externes. Leur expression est dépendante de nombreux facteurs comme l'âge du biofilm et les souches qui le compose, rendant complexe le développement de thérapies tournées vers ces cibles.

1.3.2.4. Vésicules membranaires

Les vésicules membranaires présentées en § 1.2.2 sont des structures lipidiques complexes et hétérogènes d'une taille variant de 20 à 400 nm de diamètre³¹. Dérivées de la membrane externe des bactéries Gram négatif, leur lumière est constituée de périplasme. Chez les bactéries Gram positif, elles sont sécrétées à partir du cytoplasme bactérien. Elles jouent alors un rôle essentiel dans la matrice du biofilm, en transportant des constituants intracellulaires divers : protéines, lipides, acides nucléiques et autres biomolécules⁷⁷.

D'une part, les vésicules membranaires interagissent avec les autres bactéries et assurent la communication au sein d'un biofilm, le *quorum sensing*. A travers le transport d'auto-inducteurs notamment hydrophobes ou de molécules hydrophiles sensibles aux dégradations, les vésicules assurent le développement coordonné du biofilm³¹. Par exemple, PQS (pour *Pseudomonas quinolone signal*) est une molécule hydrophobe majeure dans le *quorum sensing* chez *P. aeruginosa* permettant de générer des facteurs de virulence, moduler les réponses immunitaires de l'hôte ou encore permettre l'acquisition du fer comme nutriment⁷⁸. Il a ainsi été évalué que 86% de PQS est transporté à travers des vésicules membranaires⁷⁹. Les vésicules sont également capables de transporter des enzymes et récepteurs qui permettent l'acquisition de nutriments et donc la survie cellulaire. Une analyse protéomique chez *Bacteroides fragilis* a notamment permis de démontrer que des protéines exclusivement présentes dans les vésicules membranaires ont une activité glycoside hydrolase, résultant en des produits assimilables par les bactéries⁸⁰. Les vésicules, à travers leur contenu riche en enzymes diverses, sont aussi capables de lutter contre des molécules nocives pour les bactéries telles que des espèces réactives de l'oxygène, des antibiotiques ou des molécules du système immunitaire, assurant la défense du biofilm contre des attaques externes⁷⁸. Transportant également du matériel génétique, les vésicules peuvent assurer le transfert horizontal de gènes d'antibiorésistance au sein d'un biofilm.

D'autre part, les vésicules membranaires interagissent avec les cellules eucaryotes hôtes⁷⁸. Elles sont alors impliquées dans la pathogénèse et la virulence de l'infection, en pénétrant dans les cellules et en libérant des molécules qui entraînent des dégâts cellulaires mortels⁷⁸. Il peut s'agir de facteurs de virulence ou de toxines menant à la lyse cellulaire

comme l'hémolysine chez *E. coli* ou la cholera lysine chez *Vibrio cholerae*. Chez *P. aeruginosa*, la phosphatase alcaline ou certaines phospholipases transportées par des vésicules membranaires ont démontré une activité létale contre des cellules épithéliales pulmonaires humaines⁸¹.

Grâce à leur implication dans la communication, la nutrition, la défense bactérienne ou encore la pathogénèse, les vésicules membranaires sont des éléments multifonctionnels clés des biofilms³².

1.4. Infections associées aux biofilms

Le mode de vie en biofilm joue un rôle important pour les bactéries dans de nombreux écosystèmes, leur conférant des propriétés protectrices et d'adaptation face aux perturbations de leur environnement (manque de nutriments, anoxie ou stress), il peut donc par conséquent induire des infections et pathologies néfastes chez l'humain. Il est estimé que 80% des infections bactériennes sont associées aux biofilms⁸². De manière générale, alors que les bactéries planctoniques sont responsables d'infections aiguës, les biofilms sont associés aux infections chroniques et liées au matériel médical (Figure 12).

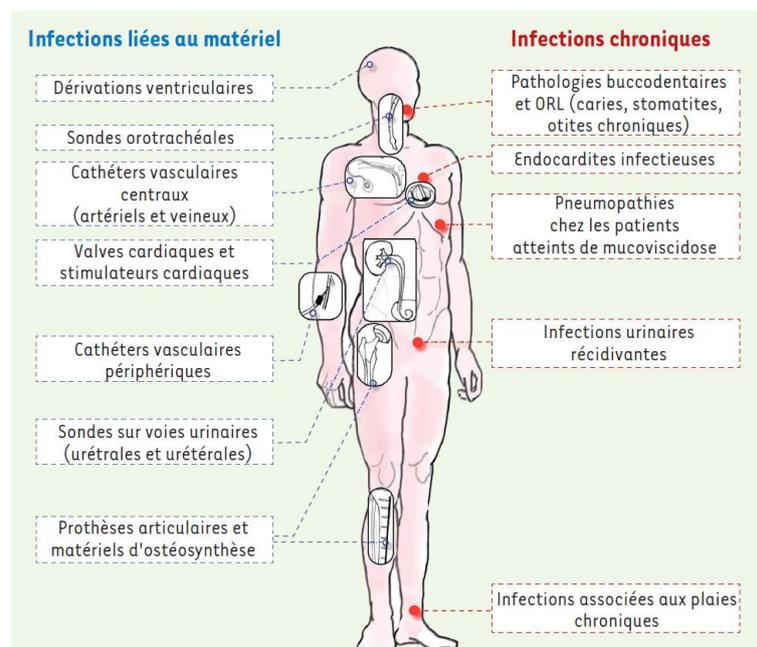


Figure 12. Principales infections associées aux biofilms (d'après Lebeaux et Ghigo¹⁵)

1.4.1. Infections associées au matériel médical

L'utilisation de dispositifs médicaux est une pratique courante pour une multitude d'applications et est en constante croissance face au vieillissement de la population¹⁵. Aux

Etats-Unis, 5 millions d'appareils médicaux sont installés par an. Cependant, une fois introduit dans le corps et dès les premières heures, un dispositif médical est sujet à colonisation par les cellules de l'organisme mais également par les bactéries. Ces bactéries peuvent être opportunistes, présentes dans l'organisme comme celles du microbiote intestinal ou de la bouche, ou exogènes, provenant de l'extérieur de l'organisme et s'introduisant suite à une contamination pré ou post-opératoire^{15,83}. Les infections associées à ces appareils peuvent se développer lentement et mettre plusieurs jours voire plusieurs mois avant que des symptômes ne se déclenchent. Plus de la moitié des infections nosocomiales sont associées aux dispositifs médicaux, tous types compris⁸⁴. Il en résulte un bilan économique élevé, un impact très négatif sur la qualité de vie du patient et peuvent s'avérer mortelles comme le démontrent les exemples présentés ci-dessous pour le cas des Etats-Unis, d'après une revue du Dr Rabih Darouiche, médecin et spécialiste des maladies infectieuses à Houston.

Parmi les implants cardiovasculaires, les valves cardiaques représentent 85 000 dispositifs posés chaque année aux Etats-Unis⁸⁴. Le taux d'infection de ces valves est de 4% pour un coût de traitement global estimé à 50 000 \$ par appareil et les biofilms associés peuvent entraîner l'apparition de pathologies chroniques comme l'endocardite infectieuse²⁸. Le taux de mortalité pour ce type d'infection y est significativement plus élevé que pour les autres types d'implants, pouvant atteindre 30% lorsque l'infection est déclenchée⁸⁴. A l'échelle mondiale, d'après la revue du Pr Sandoe, l'incidence globale de ces systèmes cardiaques en Europe (Italie et Danemark) et en Australie varie de 0,5 à 2,2%⁸⁵. Par ailleurs, quand les biofilms infectent des implants cardiovasculaires, leur dispersion dans l'organisme est facilitée à travers la circulation sanguine et peut bloquer l'arrivée du sang à des organes tels que le cerveau ou le rein²⁸. Enfin, les bactéries responsables de ces infections d'implants cardiovasculaires sont principalement du genre *Staphylococcus* avec *S. aureus* et *S. epidermidis*, mais aussi *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Enterococcus*⁵².

Avec 600 000 prothèses articulaires et 2 000 000 de dispositifs de fixation de fractures posés annuellement aux Etats-Unis, le marché des implants orthopédiques atteint des valeurs élevées. Alors que le taux d'infection de ces implants varie de 2 à 5% pour des coûts de traitement allant de 15 000 à 30 000 \$ par implant, les conséquences sur la vie du patient peuvent aller jusqu'au handicap physique⁸⁴. Pour les pays européens, l'incidence est proche de 1% en moyenne⁸⁶. Les bactéries les plus représentées dans ces infections de dispositifs médicaux non cardiovasculaires sont celles du genre *Staphylococcus* puisqu'elles sont présentes naturellement sur la peau¹⁵. Il est également possible que des bactéries telles qu'*E. coli*, *P. aeruginosa* ou *E. faecalis* s'y développent.

1.4.2. Infections chroniques

Bien que les biofilms puissent être commensaux, de nombreuses souches pathogènes entraînent l'apparition d'infections chroniques. Cliniquement, elles sont caractérisées par une durée d'infection supérieure à 30 jours, croissent et déclinent régulièrement, sont généralement localisées sur un même site et présentent une réponse incomplète aux antibiotiques avec une réémergence de l'infection à l'arrêt du traitement⁸⁷. Les conséquences économiques et cliniques de ces infections sont toutes aussi lourdes que celles associées à un dispositif médical. Différents exemples tirés d'une revue rédigée par le Dr Randall Wolcott, médecin et directeur médical aux hôpitaux de Lubbock (Etats-Unis), sont présentés ci-dessous.

Les infections chroniques du système respiratoire sont responsables aux Etats-Unis de 4 000 000 de nouveaux cas par an et d'une mortalité annuelle estimée à 170 000 patients, atteignant des valeurs bien plus élevées que les infections associées à des dispositifs médicaux⁸⁷. En terme de coût de santé, il est estimé que 35 000 000 \$ sont dépensés annuellement pour l'ensemble de ces infections. La mucoviscidose est la première maladie pour laquelle un biofilm a été identifié¹⁰. Il s'agit d'une pathologie génétique mortelle entraînant la production d'un mucus épais en grande quantité, obstruant les voies respiratoires. La clairance mucociliaire y est ralentie et le développement de biofilms y est favorisé¹⁵. Les principales bactéries impliquées dans cette pneumopathie sont *S. aureus* et *H. influenzae* pendant l'enfance puis *P. aeruginosa* pour 80% des patients jeunes adultes²⁸. Le mode de vie en biofilm confère la récurrence de l'infection et l'échec des traitements antibiotiques prescrits et a pour conséquence d'induire une inflammation chronique, entraînant des dommages tissulaires et fonctionnels sévères sur cette zone déjà fragilisée par la maladie⁸⁸.

Concernant les infections associées aux plaies cutanées chroniques, elles sont responsables de la mort de 270 000 patients annuellement pour une incidence de près de 2 000 000 de cas par an aux Etats-Unis⁸⁷. Les coûts de santé associés sont estimés à 18 000 000 \$ annuels dans ce même pays. Les plaies chroniques comme les ulcères et notamment ceux de pieds diabétiques, les coupures, les chirurgies et les brûlures sont associés à des biofilms pour plus de 60% d'entre elles¹⁵. Ces derniers recouvrent la couche externe de la blessure et peuvent également s'introduire dans les couches les plus profondes de la peau, en favorisant le développement d'inflammations chroniques. *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* sont les principaux microorganismes impliqués dans ces infections⁸⁹.

Enfin, de nombreuses autres pathologies sont associées à des biofilms telles que les infections urinaires, les méningites, les ostéomyélites, les rhinosinusites, les otites, les endophtalmies, les prostatites ou encore les pathologies buccodentaires telles que les caries.

Le coût global annuel du traitement des infections associées à des biofilms a été estimé à 94 000 milliards \$ aux Etats-Unis pour une mortalité annuelle atteignant 550 000 patients, faisant des infections à biofilms une priorité de santé publique⁸⁷.

1.5. Récalcitrance aux antibiotiques

Alors que le système immunitaire ne parvient pas à prendre en charge l'élimination des bactéries sous la forme de biofilms, les antibiothérapies conventionnelles font également face à un échec thérapeutique, entraînant la persistance des biofilms dans les infections chroniques. Deux phénomènes sont responsables de cette récalcitrance aux antibiotiques : d'une part, la résistance des bactéries et d'autre part, la tolérance induite par les biofilms^{1,90}.

1.5.1. Résistance et tolérance aux antibiotiques : définitions

La résistance d'une bactérie pour un antibiotique se définit par sa capacité à se multiplier en présence de cette molécule toxique¹. Elle est caractérisée dans des cultures planctoniques en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI), correspondant à la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne d'après l'Institut des Normes Cliniques et de Laboratoire⁹¹. Plus cette valeur est grande, plus la souche est résistante à cet antibiotique. La résistance aux antibiotiques peut être naturelle si le genre bactérien est intrinsèquement insensible, et elle peut s'acquérir par mutation. Elle est génotypique, c'est-à-dire qu'elle se transmet à la descendance bactérienne, et est causée par différents mécanismes comme la surexpression de pompes à efflux permettant d'évacuer l'antibiotique du cytoplasme des bactéries, la réduction de la perméabilité membranaire mais également l'altération des cibles antibiotiques et des antibiotiques eux-mêmes par activité enzymatique¹. Pour l'Organisation des Nations Unies, la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui l'une des plus grandes menaces pour la santé mondiale et la sécurité alimentaire.

La tolérance d'une bactérie pour un antibiotique se définit par sa capacité à survivre (sans pour autant croître) à l'effet bactéricide d'un antibiotique ou autre agression physique telle que la lumière UV, les métaux lourds ou la phagocytose¹. La susceptibilité d'une bactérie pour un antibiotique n'est pas impactée (CMI non modifiée), mais sa tolérance est évaluée par la concentration minimale bactéricide (CMB), correspondant à la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour tuer 99,9% des bactéries initialement présentes. Lorsque le ratio CMB/CMI est supérieur ou égal à 32, on parle de bactéries tolérantes. Les biofilms

peuvent alors survivre face à des concentrations d'antibiotique pouvant atteindre jusqu'à 1000 fois sa CMI⁹². La tolérance est phénotypique et réversible dès le retour à des conditions plus favorables à l'action de l'antibiotique. Il s'agit d'un processus d'adaptation physiologique causé par différents mécanismes décrits ci-dessous, comme la réponse SOS ou stringente menant au ralentissement du métabolisme cellulaire et à la persistance de bactéries⁹³. Ainsi, la tolérance précéderait l'apparition de résistances bactériennes.

1.5.2. Processus multifactoriel de récalcitrance

Les mécanismes de tolérance et de résistance aux antibiotiques sont interdépendants et conduisent à un processus multifactoriel de défense et de survie face aux perturbations environnementales (Figure 13)⁹⁰. Ils dépendent de nombreux facteurs tels que l'antibiotique, le genre et la souche bactérienne ainsi que l'âge du biofilm et son état de maturité⁹⁴.

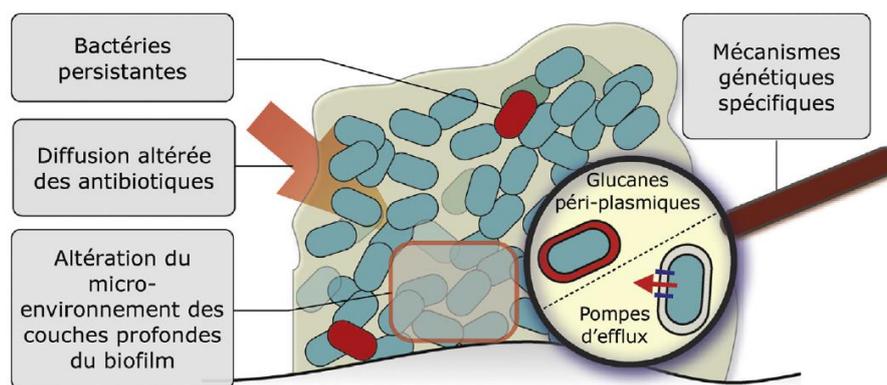


Figure 13. Principaux mécanismes impliqués dans la récalcitrance des biofilms aux antibiotiques (d'après Lebeaux *et al.*⁹⁵)

1.5.2.1. Pénétration altérée des antibiotiques par séquestration dans la matrice

La matrice du biofilm agit comme une véritable barrière protectrice, altérant la pénétration de certains antibiotiques. A l'aide d'antibiotiques conjugués avec des marqueurs fluorescents comme le Cy5, leur pénétration dans des biofilms peut être évaluée par microscopie confocale. Dans un biofilm de *P. aeruginosa* de la souche PA01, la tobramycine n'est par exemple pas capable de diffuser en profondeur, restant bloquée à la périphérie du biofilm et induisant une activité antibiotique seulement locale (Figure 14, Cy5-tob)⁹⁶. Ce comportement pourrait être régi par des interactions électrostatiques entre cet antibiotique

chargé positivement et les composants du biofilm chargés négativement. La ciprofloxacine, molécule antibiotique neutre, est ainsi capable de diffuser en profondeur dans les biofilms PA01 (Figure 14, Cy5-cipro)⁹⁶.

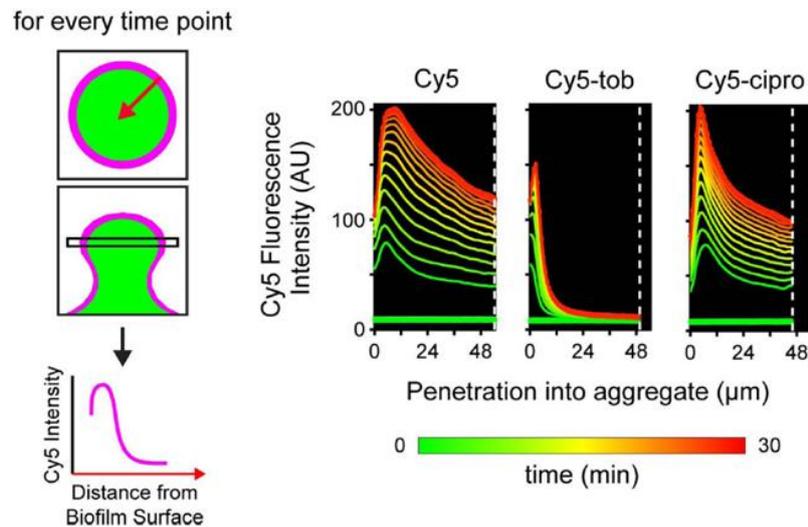


Figure 14. Cinétique de pénétration de la tobramycine et de la ciprofloxacine marquées par de la Cy5 (respectivement Cy5-tob et Cy5-cipro) dans des biofilms de *P. aeruginosa* (adapté de Tseng *et al.*⁹⁶)

Parmi les composants responsables de la séquestration des antibiotiques dans la matrice, Psl (présenté en § 1.3.2.1), exopolysaccharide sécrété par *P. aeruginosa*, est impliqué dans la tolérance à la colistine, la polymixine B ou encore la tobramycine⁹⁷. D'après une étude menée au MIT, des mutants inhibant l'expression de Psl ont induit des CMB plus faibles pour ces antibiotiques alors que des mutants sur-exprimant Psl augmentaient leur CMB et donc la tolérance de *P. aeruginosa* face à ces antibiotiques. Psl séquestrerait ces antibiotiques cationiques dans la matrice à travers des interactions électrostatiques. Des résultats similaires ont été décrits avec Pel, un autre polysaccharide principalement retrouvé chez *P. aeruginosa*, et impliqué dans la tolérance aux aminoglycosides. La surexpression de Pel dans deux souches de *P. aeruginosa* a notamment induit une survie bactérienne plus importante face à l'action de la tobramycine⁹⁸. Pour l'une des deux souches, PA14, l'inhibition de l'expression de Pel a induit un taux de survie bactérienne plus faible. Enfin, Chiang *et al.* ont démontré que l'ADNe était responsable de la tolérance de biofilms de *P. aeruginosa* aux aminoglycosides tels que la tobramycine, en séquestrant ces derniers par interactions électrostatiques⁹⁹. Des biofilms déficients en ADNe ont également pu intégrer de l'ADN exogène, conduisant à la tolérance à la tobramycine.

Par ailleurs, il a été démontré que la tétracycline pouvait atteindre l'ensemble des bactéries d'un biofilm d'*E. coli* après 10 min d'exposition alors que 90% des bactéries ont

survécu sous forme de biofilms contre 2% sous forme planctonique après 1h d'exposition¹⁰⁰. Une étude par microscopie confocale menée à Paris par Boudjema *et al.* a confirmé cet effet avec d'autres antibiotiques et biofilms¹⁰¹. La daptomycine conjuguée à un fluorophore de type Bodipy était capable de diffuser efficacement dans un biofilm de *S. aureus* et d'atteindre les bactéries cibles sans toutefois éradiquer le biofilm *in vitro*. Egalement, la rifampicine est un antibiotique capable de pénétrer la matrice de biofilms de staphylocoques^{102,103}. Cependant, elle ne permet pas non plus d'éradiquer entièrement les bactéries des biofilms, mettant en lumière d'autres facteurs impliqués dans l'échec des antibiothérapies comme la présence d'un microenvironnement non favorable à l'action des antibiotiques ou l'insensibilité des bactéries dormantes présentes dans un biofilm face au mécanisme d'action de certains antibiotiques¹⁰².

1.5.2.2. Microenvironnement favorable à l'émergence de bactéries persistantes

La structure spécifique d'un biofilm résulte en la présence de gradients de nutriments, d'oxygène et de pH, conférant une hétérogénéité physico-chimique au sein du biofilm⁹⁰. Des facteurs comme les variations de pH peuvent induire la tolérance à un antibiotique. Par exemple, la susceptibilité de *S. aureus* à la gentamicine est moins élevée à pH acide qu'à pH physiologique (augmentation de la CMI et de la CMB)¹⁰⁴. Le gradient de pH à l'intérieur d'un biofilm pouvant atteindre des conditions acides⁵¹, de plus fortes concentrations en gentamicine sont nécessaires pour éradiquer *S. aureus*. Par ailleurs, les gradients de nutriments et d'oxygène peuvent induire des caractéristiques génétiques et métaboliques différentes aux bactéries selon leur localisation dans le biofilm¹. Alors que les bactéries présentes en surface peuvent disposer aisément des ressources nutritives disponibles, les bactéries en profondeur s'adaptent afin de survivre dans des conditions pauvres en ressources énergétiques. Leur métabolisme est ralenti, rendant ainsi l'action de certains antibiotiques inefficace. Par exemple, la rifampicine a présenté une activité très limitée et similaire *in vitro* entre un biofilm de *S. epidermidis* et les mêmes bactéries sous forme planctonique en phase stationnaire, alors que son activité est significativement plus élevée lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance¹⁰⁵. De plus, la faible mortalité des bactéries du biofilm a été localisée à sa surface, zone riche en nutriments, et l'augmentation de l'apport en nutriments et en oxygène tendait à augmenter la mortalité des bactéries présentes dans le biofilm. Dans une autre étude, il a été démontré que l'apport d'arginine et de nitrate stimule l'activité métabolique de *P. aeruginosa* dans des zones de biofilms pauvres en oxygène, augmentant leur sensibilité à l'action d'antibiotiques comme la tobramycine et la ciprofloxacine¹⁰⁶.

Ces bactéries qui survivent à la présence d'antibiotiques et sont tolérantes à leur action sont appelées bactéries persistantes¹. Cette population bactérienne serait principalement responsable du taux basal de survie bactérienne observé après action antibiotique sur des biofilms bactériens *in vitro* et *in vivo*, menant à l'incapacité d'éradiquer complètement un biofilm¹⁰⁷. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la persistance de ces bactéries (Figure 15)¹⁰⁷.

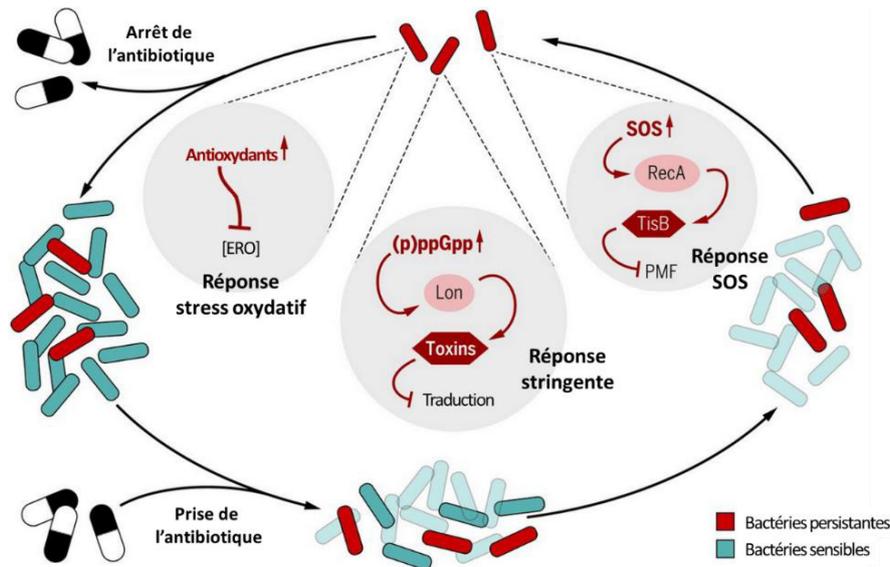


Figure 15. Mécanismes de persistance bactérienne et conséquences sur l'antibiothérapie (adapté d'Harms *et al.*¹⁰⁸)

La réponse stringente est un phénomène observé lorsque les bactéries sont dans un environnement pauvre en nutriments ou face à un stress. Brièvement, lorsqu'une bactérie est privée de nutriments comme des acides aminés, la voie de signalisation médiée par l'alarmone (p)ppGpp est suractivée et résulte en la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la survie bactérienne¹⁰⁹. Un module toxine/antitoxine serait responsable du basculement de l'état métabolique des bactéries vers la dormance temporaire, dans une phase métabolique de non-division. La toxine inhibe les fonctions cellulaires principales des bactéries pendant que l'antitoxine inhibe l'effet de la toxine maintenant un équilibre dans l'état métabolique bactérien¹¹⁰. Il a été démontré *in vitro* qu'un biofilm mutant de *P. aeruginosa* déficient en (p)ppGpp et incapable d'établir une réponse stringente, était significativement plus sensible à l'ofloxacine ou à la gentamicine, contrairement à une souche sauvage non délétère en (p)ppGpp¹¹¹. Cet effet a été confirmé *in vivo* par une étude menée dans l'équipe du Dr Pradeep Singh aux Etats-Unis sur des souris infectées intrapéritonéalement par *P. aeruginosa*, souche sauvage ou délétère en (p)ppGpp. Après traitement à l'ofloxacine, 35% des souris possédant la souche sauvage ont survécu contre 70% des souris ayant la souche mutée¹¹¹.

Dans le cas de la réponse SOS, mécanisme cellulaire répondant aux dommages subis par l'ADN bactérien et causé par des antibiotiques par exemple, les bactéries peuvent aussi rentrer en dormance en adaptant leur métabolisme, rendant ainsi l'action de l'antibiotique inefficace¹¹². Bernier *et al.* ont démontré que la privation en nutriments (acides aminés et source carbonée) induisait une réponse SOS dans des biofilms d'*E. coli*. La force proton motrice (PMF) était alors réduite, limitant la diffusion de certains antibiotiques à travers la membrane et menant ainsi à une meilleure tolérance à l'ofloxacine et à la ticarcilline¹¹³.

La défense contre le stress oxydatif correspond aux mécanismes impliqués dans la protection contre les produits métaboliques de l'aérobie tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'anion superoxyde (O₂⁻)¹. Ces espèces réactives de l'oxygène causent des dégâts moléculaires en se fixant à l'ADN ou les protéines de la bactérie. Potentiellement induites par l'action d'antibiotiques, ces réactions engendrent la mort bactérienne. Les bactéries peuvent alors développer un métabolisme de persistance pour lutter contre ce stress oxydatif, à travers la surexpression d'antioxydants¹¹⁴.

1.5.2.3. Conséquences des concentrations antibiotiques sous-inhibitrices

Face à ces phénomènes multifactoriels de récalcitrance causés par le mode de vie en biofilms, les antibiotiques peuvent se retrouver en concentrations sous-inhibitrices dans un biofilm. Pour certains antibiotiques, ces concentrations sous-inhibitrices peuvent avoir un effet délétère amplifiant la récalcitrance aux antibiotiques, favorisant la résistance aux antibiotiques et induisant même la formation de nouveaux biofilms¹. Ainsi, l'exposition de *S. aureus* à des concentrations sous-inhibitrices de ciprofloxacine (0.2x CMI), de gentamicine (0.2x CMI) ou d'oxacilline (0.5x CMI) a engendré la formation de bactéries persistantes devenant de ce fait tolérantes aux antibiotiques testés¹¹⁵. Gullberg *et al.* ont pour leur part démontré que des concentrations de streptomycine et tétracycline 4 à 60 fois plus faibles que leurs CMIs induisaient l'augmentation significative du nombre de mutants de *Salmonella typhimurium* résistants à ces antibiotiques¹¹⁶. Enfin, l'exposition de biofilms de *P. aeruginosa* et de *E. coli* à des concentrations sous-inhibitrices d'aminoglycosides a provoqué la formation de biofilms¹¹⁷. En cause, un gène de régulation de la réponse aux aminoglycosides, appelé *arr*, codant pour une phosphodiesterase dont le substrat est le c-di-GMP. Il s'agit d'un second messenger qui régule la capacité d'adhésion bactérienne à une surface. Lorsque ce gène est muté en présence de faibles concentrations d'aminoglycosides, les mutants de *P. aeruginosa* ont une activité catalytique de c-di-GMP diminuée, entraînant l'augmentation de l'adhésion bactérienne médiée par c-di-GMP, et le développement du biofilm¹¹⁷.

1.5.3. Impact de la diversité génétique au sein d'un biofilm

1.5.3.1. Transfert horizontal de gènes d'antibio-résistance

Présenté en § 1.3.2.3, l'ADNe est impliqué dans le transfert horizontal de gènes d'antibio-résistance entre bactéries au sein d'un biofilm grâce aux processus de conjugaison, transformation naturelle, transduction, et par des agents de transfert de gènes (Figure 11). Chez *S. aureus*, il a été prouvé que la fréquence de conjugaisons responsables du transfert de plasmides bactériens était significativement plus élevée sous la forme de biofilms, grâce à la proximité spatiale entre bactéries¹¹⁸. Il en était de même pour *Campylobacter jejuni* et le transfert de gènes de résistance à la kanamycine et au chloramphénicol¹¹⁹.

La capacité à acquérir une résistance antibiotique à travers ce transfert horizontal de gènes peut également être régulée grâce à d'autres phénomènes impliqués dans la tolérance du biofilm. Les intégrons de classe I sont des systèmes qui permettent aux bactéries de cliver et d'insérer des cassettes génétiques, notamment d'antibio-résistance, dans leur ADN. Strugeon *et al.* ont démontré que l'expression de l'intégrase, enzyme impliquée dans la catalyse de ces systèmes d'intégrons, est directement régulée par la réponse stringente lors d'une privation en nutriments dans des biofilms d'*E. coli*¹²⁰.

1.5.3.2. Mutagénèse bactérienne induite

La mutagénèse, processus de mutation des gènes d'une cellule, se déroule plus fréquemment lorsque les bactéries vivent sous le mode de biofilms. Bae *et al.* ont évalué la fréquence de mutation de gènes codant pour la gyrase A, impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones, chez *C. jejuni*. En présence de concentrations de ciprofloxacine égales à sa CMI, la fréquence de mutation de ces gènes était significativement plus élevée lorsque *C. jejuni* se développait sous la forme de biofilms par rapport à la forme planctonique¹²¹.

Par ailleurs, l'augmentation de la fréquence de mutations de gènes impliqués dans la résistance à la rifampicine et à la mupirocine dans des biofilms de *S. aureus* en présence de concentrations antibiotiques jusqu'à 4 fois leurs CMIs dépend d'un autre processus impliqué dans la tolérance des biofilms : le stress oxydatif¹²². L'analyse du profil génétique des biofilms de *S. aureus* ayant subi des mutagénèses a révélé la surexpression du gène codant pour la superoxyde dismutase. De plus, l'incorporation d'antioxydants dans ces biofilms a induit une diminution des fréquences de mutation des gènes de résistance aux antibiotiques étudiés.

1.5.4. Physiopathologie des biofilms bactériens : cas des infections d'implant par *S. aureus*

S. aureus est une bactérie Gram positif, commensale et retrouvée principalement au niveau du tractus respiratoire supérieur et de la peau. Cela en fait un pathogène opportuniste capable de former un biofilm au sein d'un organisme lorsque le système immunitaire n'est pas parvenu à l'éliminer, aboutissant à une infection persistante. Il est notamment retrouvé dans des infections comme l'ostéomyélite, la périodontite, la rhinosinusite, l'endocardite ou encore celles associées aux plaies cutanées chroniques et aux dispositifs médicaux²¹. Ainsi, on retrouve majoritairement *S. aureus* lors de l'infection d'implants, responsable d'un fort taux de mortalité¹²³. En cause, les biofilms à *S. aureus* présentent des caractéristiques physiopathologiques propres et adaptées à l'invasion des dispositifs médicaux implantés chez l'humain.

La formation de biofilms à *S. aureus* sur des dispositifs médicaux commence par l'étape d'adhésion bactérienne. Les bactéries adhèrent aux protéines de la matrice humaine qui ont rapidement colonisé l'implant après chirurgie. L'adhésion est médiée par les protéines *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) qui sont surexprimées à la surface de *S. aureus*, et se fixent notamment aux fibrinogènes, fibronectines, et collagène de l'hôte. Un attachement direct à l'implant est également possible par des forces d'interactions non spécifiques¹²³. Les bactéries prolifèrent ensuite en formant un biofilm multicouche et elles sécrètent les substances polymériques de la matrice. Le *polysaccharide intercellular antigen* (PIA) produit par l'opéron *icaADBC* est notamment l'exopolysaccharide spécifique de la matrice d'un biofilm de *S. aureus*. Sa production est directement responsable de l'intégrité structurelle et de la formation des biofilms. L'expression de cet opéron peut être régulée par différents facteurs comme l'anaérobie, la présence de nutriments, l'osmolarité, la température ou la présence d'antibiotiques¹²⁴. Cependant, la formation de biofilms indépendante à PIA est également possible à travers des protéines telles que la *Biofilm-associated protein* (Bap). Par ailleurs, des gènes tels que *cidA*, codant pour une protéine impliquée dans la lyse bactérienne, ou des autolysines sont surexprimés pour libérer l'ADN dans la matrice, élément crucial dans le développement des biofilms à *S. aureus* (§ 1.3.2.3)²¹. Les études ayant utilisé de la DNase pour éradiquer des biofilms de *S. aureus* en complément d'antibiotiques ont d'ailleurs démontré des résultats prometteurs^{70,124}.

Phénomène majeur dans la virulence et la protection de ces infections, les mécanismes de dormance et de persistance des bactéries chez *S. aureus* ne sont pas encore complètement élucidés¹²⁴. Cependant, lorsqu'une forte densité de bactéries *S. aureus* s'accumule sur un

implant, la privation en nutriments est induite et tend à former des gradients d'oxygène et de pH au sein du biofilm néoformé, rendant les bactéries en profondeur insensibles à l'action de certains antibiotiques¹²⁵. Également, la pénétration d'antibiotiques dans les biofilms à *S. aureus* est réduite par plusieurs facteurs dont l'ADNe¹²⁶. Par ailleurs, le locus *agr*, responsable du *quorum sensing* chez *S. aureus*, est directement impliqué dans les processus d'évasion du système immunitaire^{44,45}. Lorsqu'une certaine densité bactérienne est atteinte, *agr* est suractivé et permet de réguler de façon coordonnée l'expression de protéines telles que l'*autoinducing peptide* (AIP) ainsi que des toxines et facteurs bloquant la signalisation immunitaire¹²³.

Les infections associées aux dispositifs médicaux sont cependant rarement composées d'une seule espèce bactérienne. Des biofilms multi-espèces composés par exemple de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *E. faecalis* ont été identifiés sur de nombreuses infections allant des prothèses aux cathéters¹²⁷. L'effet de ces infections poly-microbiennes n'est cependant pas encore bien étudié, mais elles pourraient être plus virulentes que les infections par des espèces uniques¹²³. De plus, des bactéries comme *P. aeruginosa* seraient plus compétitives que *S. aureus*, menant à une plus grande colonisation de la surface des implants et une éradication partielle de *S. aureus*¹²⁸.

Les traitements antibiotiques dont disposent actuellement les cliniciens pour traiter les infections à biofilms sont ainsi peu adaptées à leurs spécificités. Dans la suite de ce manuscrit, je présenterai les nouvelles stratégies anti-biofilms, en considérant les caractéristiques propres des biofilms.

2. LES THERAPIES ANTI-BIOFILMS

2.1. Thérapies conventionnelles

Aujourd'hui, l'unique traitement curatif disponible pour traiter les infections bactériennes est la prise d'antibiotiques, initialement développés en prouvant leur efficacité sur des bactéries planctoniques. Ils sont en revanche peu efficaces sur les biofilms du fait de la récalcitrance présentée dans le chapitre précédent, conduisant à la chronicité et la persistance des infections⁹⁵.

2.1.1. Définition et activité d'un antibiotique

Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique capable d'inhiber la croissance des bactéries ou de les tuer. Dans le premier cas, il s'agit d'un antibiotique bactériostatique et son efficacité est caractérisée par la CMI, correspondant à la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne, visible dans une culture liquide après 18h d'incubation (Figure 16). Dans le second, il s'agit d'un antibiotique bactéricide et est caractérisé par sa CMB, correspondant à la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour tuer 99,9% des bactéries initialement présentes après 18h d'incubation sur des géloses à partir des suspensions obtenues dans le test de CMI (Figure 16). Un même antibiotique peut avoir les deux capacités en fonction de la concentration utilisée mais lorsque le ratio CMB/CMI est supérieur à 32, il est considéré comme étant bactériostatique uniquement.

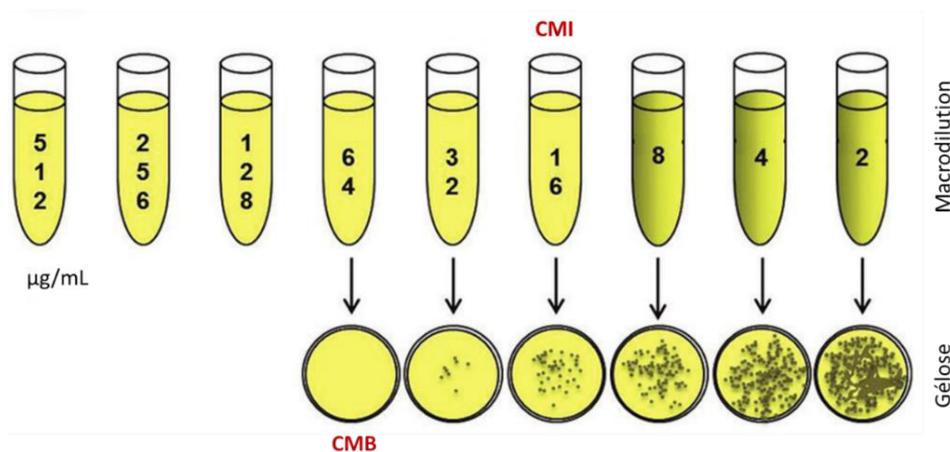


Figure 16. Détermination de la CMI et CMB d'un antibiotique pour une souche bactérienne donnée (adapté de Karaman¹²⁹)

2.1.2. Classification des antibiotiques

Les familles d'antibiotiques sont classées en fonction de leur mécanisme d'action. Elles ciblent la paroi bactérienne, la synthèse protéique ou la synthèse nucléique¹³⁰ (Figure 17).

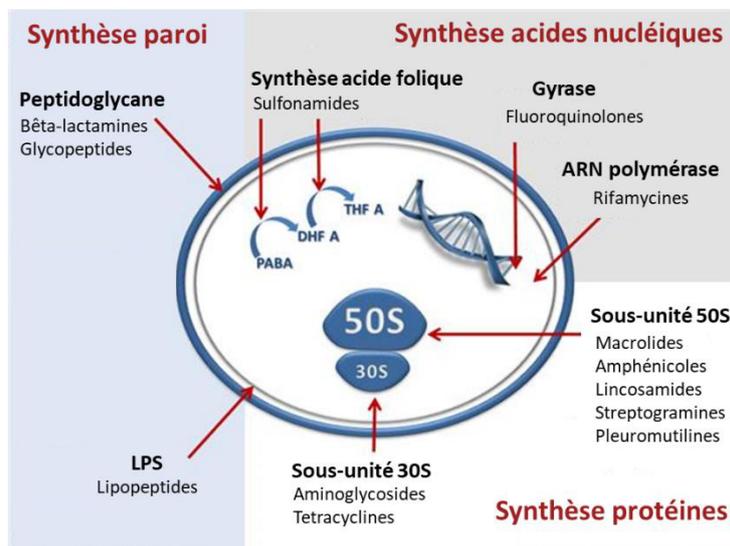


Figure 17. Différentes classes d'antibiotiques en fonction de leur cible dans la bactérie (adapté de Kapoor *et al.*¹³⁰)

Parmi les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne, on retrouve la famille des bêta-lactamines. Composés d'un cycle bêta-lactame, ces antibiotiques regroupent diverses pénicillines comme l'ampicilline ainsi que des céphalosporines, carbapénèmes et monobactames. Ils ciblent spécifiquement des protéines membranaires bactériennes appelées *Penicillin Binding Proteins* impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, constituant vital des bactéries. L'inhibition de cette synthèse entraîne la lyse membranaire et la mort des bactéries¹³¹. La famille des glycopeptides tels que la vancomycine ou la dalbavancine est également impliquée dans l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane en ciblant des précurseurs peptidiques de la paroi¹³⁰. De même, la famille des lipopeptides telle que la polymyxine B cible spécifiquement le LPS et entraîne la dégradation de la membrane externe des bactéries Gram négatif.

Au sein des familles d'antibiotiques ciblant la synthèse protéique, on distingue celles ciblant les sous-unités 30S des ribosomes bactériens et celles ciblant les sous-unités 50S. Les aminoglycosides tels que la gentamicine ou la tobramycine, par la formation de pores dans la membrane bactérienne, pénètrent dans le cytoplasme bactérien et ciblent l'ARN ribosomique 16S de la sous-unité 30S entraînant l'interruption de la traduction des ARNm¹³⁰. Les tétracyclines, telles que la doxycycline ou la minocycline, partagent la même cible. Au niveau

des sous-unités 50S, les différentes familles d'antibiotiques ciblent principalement l'ARN ribosomal 23S. On retrouve les macrolides comme la clarithromycine ou l'azythromycine, les amphénicoles comme le chloramphénicol, ou encore les lincosamides tels que la clindamycine¹³².

Parmi les familles d'antibiotiques ciblant la synthèse nucléique, on distingue les fluoroquinolones (ciprofloxacine ou levofloxacine) capables d'inhiber l'activité de la gyrase bactérienne impliquée dans la réplication de l'ADN, et les sulfonamides ciblant la synthèse de l'acide folique, précurseur de la synthèse d'acides nucléiques¹³⁰. La famille des rifamycines, comprenant notamment la rifampicine, est impliquée dans l'inhibition de l'activité de l'ARN polymérase responsable de la transcription de l'ADN bactérien.

2.1.3. Efficacité anti-biofilm de certains antibiotiques

Alors que la prescription d'antibiotiques suit une stratégie clinique agressive (précoce, sur de longues périodes et nécessitant parfois des combinaisons d'antibiotiques) face à l'échec de ces traitements dans les infections à biofilms, certains d'entre eux présentent des propriétés anti-biofilms intéressantes¹³³.

La ceftazidime a par exemple démontré plusieurs propriétés anti-biofilms contre la souche PA01 de *P. aeruginosa in vitro* à des concentrations sous-inhibitrices¹³⁴. A $\frac{1}{4}$ de sa CMI, cet antibiotique est capable de réduire la biomasse du biofilm mais également d'inhiber la mobilité bactérienne et de réduire l'expression de macromolécules jouant un rôle majeur dans la formation du biofilm telles que LecA, LecB, Pel et Psl. Dans une autre étude, un traitement à l'azythromycine a permis de mettre en évidence que des concentrations sous-inhibitrices inhibaient la synthèse de signaux impliqués dans le *quorum sensing* de *P. aeruginosa* (la N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone et la N-butanoyl homoserine lactone) mais également la mobilité bactérienne et la formation partielle du biofilm *in vitro*¹³⁵. Dans un modèle d'infection du tractus urinaire chez la souris, le traitement à l'azythromycine a mené vers l'éradication complète de *P. aeruginosa* dans les reins des souris¹³⁵.

Chez les staphylocoques, parmi une large gamme d'antibiotiques testés pour éradiquer des biofilms de *S. aureus* et de *S. epidermidis*, la rifampicine avait une CMEB₉₀ (concentration permettant d'éradiquer 90% du biofilm) de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre plus de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour tous les autres antibiotiques testés comme la vancomycine, la ciprofloxacine ou encore la tygecycline¹³⁶. En revanche, sur plusieurs souches cliniques de *S. epidermidis*, l'exposition à des concentrations sous-inhibitrices de ciprofloxacine a permis de réduire partiellement la biomasse des biofilms *in vitro*, suggérant un effet souche-dépendant¹³⁷.

Alors que les thérapies antibactériennes actuellement prescrites ont été développées avant que le mode de vie bactérien en biofilms soit caractérisé dans la plupart des pathologies cliniques, les connaissances fondamentales actuelles permettent de développer de nouvelles stratégies adaptées aux propriétés spécifiques que confère un biofilm¹.

2.2. Nouvelles approches anti-biofilms

Les agents anti-biofilms ciblent différents mécanismes impliqués tout au long de la formation du biofilm, de l'adhésion bactérienne à un biofilm mature. On peut distinguer les stratégies capables d'inhiber la formation d'un biofilm lors de l'adhésion bactérienne, de la production de matrice ou encore du *quorum sensing*, ainsi que les stratégies impliquées dans la perturbation d'un biofilm établi par la dégradation de la matrice ou la dispersion des bactéries (Figure 18).

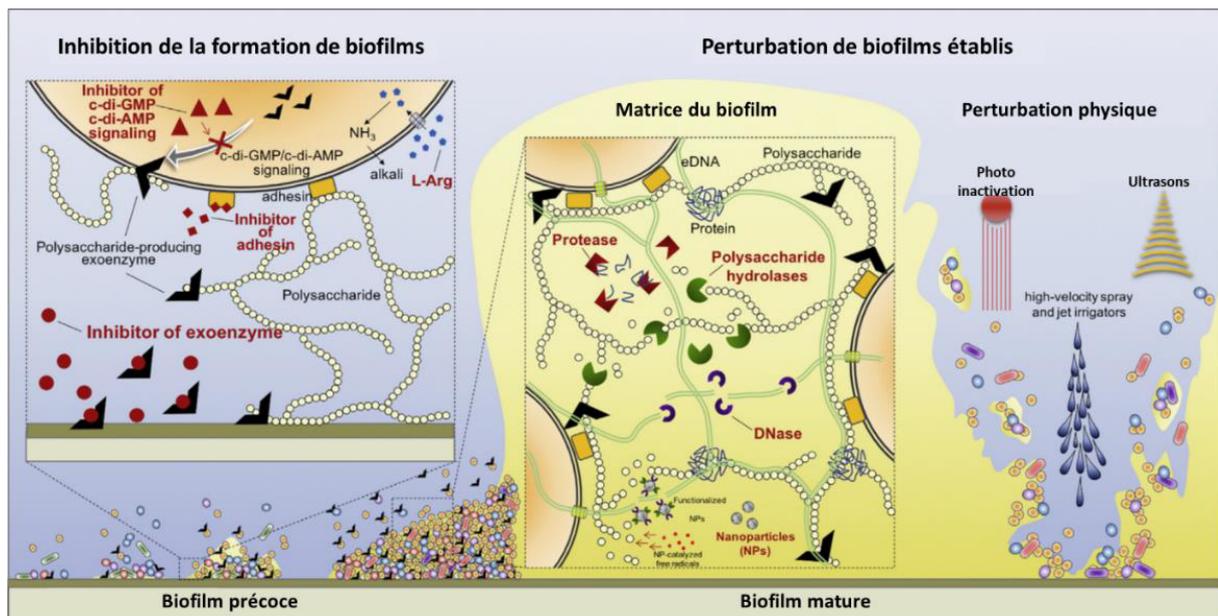


Figure 18. Stratégies thérapeutiques ciblant le mode de vie bactérien en biofilms (adapté de Karygianni *et al.*⁴⁹)

Alors que les principales stratégies anti-biofilms sont détaillées dans la partie suivante de manière non exhaustive, de nombreux autres composés qui ne sont pas abordés ici ont été étudiés dans le traitement des biofilms, et dont le mécanisme est encore inconnu pour certains, mettant les stratégies anti-biofilms au cœur d'un développement actuel très important¹. De nombreuses études de screening ont été conduites *in vitro* et *in silico* pour

identifier des agents thérapeutiques potentiels, et la base de données aBiofilm contient notamment plus de 5000 agents anti-biofilms répertoriés depuis 1988¹³⁸.

2.2.1. Inhibition de la formation de biofilms

2.2.1.1. Inhibition de l'adhésion bactérienne à une surface

Il s'agit d'une mesure prophylactique ou agissant aux phases précoces de l'installation d'un biofilm sur une surface biotique ou abiotique. La surface de dispositifs médicaux peut ainsi être travaillée pour favoriser des propriétés physicochimiques spécifiques relatives à leur charge de surface, leur hydrophobicité ou leur composition chimique, et ainsi limiter ou inhiber l'adhésion bactérienne (Figure 19)¹³⁹. Hook *et al.* ont par exemple démontré que des souche de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* adhéraient moins lorsque les dispositifs étaient composés d'esters et hydrocarbures cycliques¹⁴⁰. L'ajout d'un revêtement polymérique à base de silicone permettait également de diminuer d'un facteur 30 la capacité des bactéries à adhérer sur ces implants, menant à une réduction de près de 97% de la surface occupée par les bactéries adhérentes. Cet effet a été confirmé *in vivo* sur un modèle de souris présentant ces implants en sous-cutané¹⁴⁰.

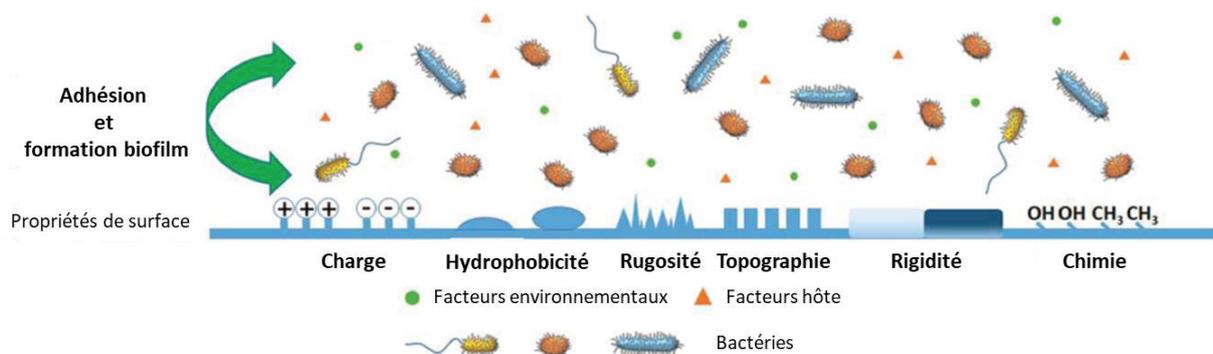


Figure 19. Principales propriétés des dispositifs médicaux impactant l'adhésion bactérienne (adapté de Song *et al.*¹³⁹)

Les dispositifs médicaux peuvent également présenter des caractéristiques biologiques en étant fonctionnalisés par des antibiotiques ou des peptides antimicrobiens¹⁴¹. Par exemple à l'université de Saragosse, Gimeno *et al.* ont développé une prothèse orthopédique composée de réservoirs en acier remplis d'antibiotiques¹⁴². La cefazoline et le linezolid ont été délivrés de manière contrôlée dans l'espace colonisable par les bactéries et ont présenté une activité bactéricide totale *in vitro* contre des bactéries planctoniques de *S. aureus* en 8h et 24h respectivement.

Il est aussi possible d'inhiber spécifiquement l'activité des molécules impliquées dans l'adhésion bactérienne par des analogues d'adhésines agissant de manière compétitive¹⁴¹. Par exemple, la fixation des adhésines de *S. mutans* à des récepteurs salivaires a été inhibée *in vitro* grâce à un peptide synthétique, le p1025, analogue d'une partie de la chaîne protéique de ces adhésines¹⁴³. *In vivo* chez l'humain, l'administration de ce peptide a empêché la colonisation des dents par *S. mutans*, contrairement à un peptide contrôle ou une solution saline¹⁴³. Cependant, comme l'adhésion bactérienne est médiée par une multitude de protéines et de récepteurs, impliqués différemment en fonction de facteurs génétiques et environnementaux, cette approche semble insuffisante pour réduire de façon significative les risques d'établissement d'un biofilm¹⁴¹.

2.2.1.2. Inhibition de la production de matrice

Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la production de la matrice coexistent au sein d'un biofilm. Parmi elles, le c-di-GMP est un messager secondaire qui contrôle la synthèse de nombreuses molécules de la matrice comme des enzymes ou des polysaccharides¹⁴⁴. Il est une cible privilégiée pour le développement de stratégies cliniques anti-biofilms non toxiques, car le système de signalisation médié par c-di-GMP n'est présent que chez les bactéries¹⁴⁵. Une étude *in vitro* de screening à haut débit a permis d'identifier sept petites molécules efficaces pour inhiber la formation de biofilms de *Vibrio cholerae in vitro*, comme le DI-3-N-(4-anilinophenyl)benzamide¹⁴⁵ ayant une activité inhibitrice de la diguanylate cyclase, enzyme synthétisant le c-di-GMP. D'autres petites molécules inhibitrices de la diguanylate cyclase ont également été identifiées par une étude *in silico* de screening¹⁴⁶. Évaluées *in vitro* par dichroïsme circulaire, deux molécules ont inhibé de manière compétitive l'activité de la diguanylate cyclase. Cependant, leur capacité à inhiber la formation d'un biofilm n'a pas été démontrée.

La glucosyltransferase est également une enzyme ciblée dans la stratégie d'inhibition de la production de matrice. En effet, elle est impliquée dans la synthèse de nombreux exopolysaccharides¹⁴⁷. Le screening à haut débit de plus de 150 000 composés disponibles commercialement pour évaluer leur capacité à interagir avec l'un des domaines de cette enzyme a mené à l'identification d'un inhibiteur potentiel, un dérivé de quinoxaline. Évaluée *in vitro*, cette molécule a démontré sa capacité à inhiber la synthèse d'exopolysaccharides et la formation de biofilms de *S. mutans* par antagonisme de l'activité de la glucosyltransferase¹⁴⁷. *In vivo* chez le rat, ce composé a significativement réduit la proportion de *S. mutans* dans la plaque dentaire des animaux et a ainsi diminué la sévérité des caries formées.

2.2.1.3. Inhibition du *quorum sensing*

Le *quorum sensing* est le système de signalisation bactérien permettant la communication entre bactéries, menant au développement coordonné des micro-colonies au sein d'un biofilm. De nombreuses stratégies s'attaquent aux molécules impliquées dans les différentes voies de signalisation en inhibant la synthèse du messageur, en le dégradant, en inhibant la liaison de la molécule signal à son récepteur ou en inhibant la cascade de signalisation. Cette stratégie d'inhibition du *quorum sensing* est regroupée sous le phénomène de *quorum quenching* (Figure 20)^{148,149}.

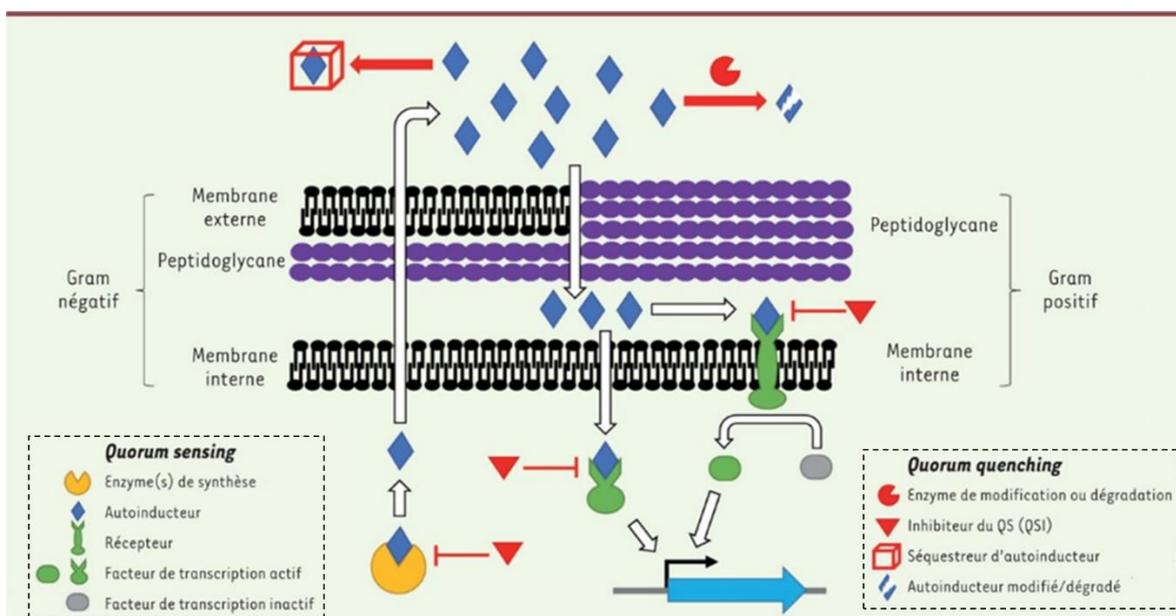


Figure 20. Différentes stratégies d'inhibition du *quorum sensing* (d'après Mion *et al.*¹⁴⁹)

Chez *S. aureus*, les composants du *quorum sensing* sont principalement codés par le système *agr*¹⁵⁰. Ce système de régulation génétique qui fait intervenir l'*autoinducing peptide* (AIP) permet notamment la synthèse de molécules signal grâce à deux ARN, ARNII et ARNIII. Molécule endogène produite par *S. aureus*, le peptide inhibiteur de RNAIII (RIP) est une molécule capable de prévenir la formation de biofilms de *S. aureus*. L'utilisation de RIP exogène a été étudiée sur un modèle de rats ayant subi une greffe d'implants sous-cutanés infectés par des injections de *S. aureus*¹⁵¹. RIP, administré immédiatement après la greffe, a démontré sa capacité à inhiber significativement la formation des biofilms comparé au contrôle non traité, sans toutefois prévenir complètement l'infection. En combinaison avec la teicoplanine, la formation des biofilms a été inhibée de manière synergique sur ce même modèle¹⁵¹.

Chez *P. aeruginosa*, deux dérivés synthétiques de furanones, isolés d'une algue marine nommée *Delisea pulchra*, étaient capables d'interférer avec l'action des acylhomoserine lactones (AHLs) dans un modèle de souris présentant une infection pulmonaire chronique¹⁵². En supprimant le *quorum sensing* de cette bactérie dans les poumons, ces dérivés ont accéléré la clairance bactérienne et réduit la sévérité de l'infection. Dans le cas d'une infection léthale sans traitement, l'utilisation de ces dérivés a permis de prolonger la durée de vie des souris infectées de manière significative.

Cependant, le *quorum sensing* est un système de signalisation impliquant différentes molécules propres à chaque micro-organisme^{1,148,149}. Cette stratégie présente donc certaines limites dans l'éradication de biofilms poly-microbiens ou de biofilms dont la souche n'a pas été identifiée par une culture microbiologique. De plus, les molécules impliquées dans le *quorum quenching* ne présentent généralement pas la capacité d'éradiquer les bactéries d'un biofilm mais de limiter la formation de ce dernier, en faisant une stratégie intéressante dans la prévention et l'inhibition de la formation d'un biofilm mais suggérant l'utilisation d'un antibiotique en combinaison thérapeutique pour l'éradication d'un biofilm mature.

2.2.2. Eradication de biofilms établis

Cliniquement, l'infection se déclare généralement plusieurs jours voire plusieurs semaines après que le biofilm se soit installé et développé dans l'organisme et se trouve donc dans un état de maturité avancé⁸⁴. Les stratégies visant à éradiquer des biofilms matures présentent donc une pertinence clinique plus importante que celles présentées ci-dessus. De plus, la dégradation de la matrice d'un biofilm entraîne la dispersion des bactéries sous l'état planctonique, susceptibles d'être prises en charge par le système immunitaire et par un traitement antibiotique combinatoire^{144,153}.

2.2.2.1. Dégradation enzymatique de la matrice

De nombreuses enzymes sont capables de dégrader les différentes macromolécules composant la matrice. Les exopolysaccharides sont une cible privilégiée dans la stratégie de dégradation de la matrice car ils assurent le maintien de l'architecture des biofilms matures. La dispersine B est une glycoside hydrolase synthétisée par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et certaines souches de *S. aureus*, capable de dégrader le PNAG ou PIA¹. Son activité contre d'autres bactéries a été évaluée *in vitro* par Dobrynina *et al.* et a notamment démontré une forte activité dans la dégradation de biofilms de *S. epidermidis*¹⁵⁴.

In vivo, deux autres glycoside hydrolases, l' α -amylase et la cellulase, ont permis de réduire significativement la biomasse de biofilms de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* et d'augmenter l'efficacité d'une thérapie combinatoire à base de gentamicine, dans un modèle de plaie murin développé par Fleming et Rumbaugh à l'université de Lubbock¹⁵⁵. Cependant, la combinaison de ces enzymes avec un antibiotique est indispensable pour éradiquer un biofilm. Le simple traitement avec des glycoside hydrolases ne permettait pas d'éradiquer *P. aeruginosa* mais au contraire, induisait sa dispersion dans des souris observées par imagerie de fluorescence de manière non intrusive sur 20h (Figure 21)¹⁵³.

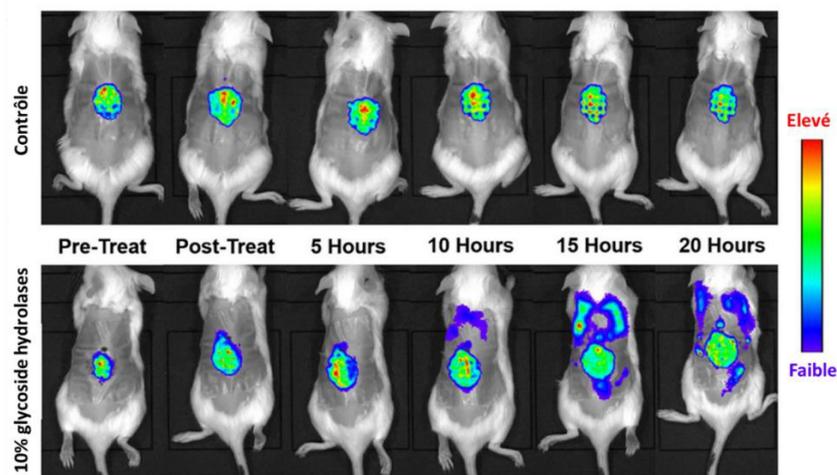


Figure 21. Images de la dispersion de *P. aeruginosa* bioluminescentes par un traitement de glycoside hydrolases dans un modèle de plaie murin (adapté de Fleming et Rumbaugh¹⁵³)

L'ADNe qui joue un véritable rôle de *scaffold* dans la structure du biofilm, peut être dégradé par des désoxyribonucléases dont la DNase I qui a fait l'objet de nombreuses publications^{69,156,157}. Les Dr Sharma et Singh ont par exemple démontré sa capacité à dégrader l'ADNe de biofilms de *P. aeruginosa*, ce qui a permis de réduire significativement la quantité de biomasse de ces biofilms *in vitro*⁶⁹. Dans une autre étude, la DNase I a permis de réduire la biomasse de biofilms de *S. aureus* et d'*E. coli* mais également de sensibiliser ces bactéries à l'activité bactéricide de l'ampicilline et de la levofloxacine *in vitro*¹⁵⁶. Enfin, Hymes *et al.* ont évalué l'activité de la DNase sur un modèle de vaginose *in vivo*. Après traitement, la colonisation de *Gardnerella vaginalis* était réduite par un facteur 10 comparé aux souris contrôles n'ayant pas reçu de traitement¹⁵⁸.

Les approches anti-biofilms impliquant des enzymes représentent une stratégie efficace et intéressante mais elles font cependant face à l'incapacité de tuer les bactéries du

biofilm. L'utilisation d'antibiotiques en combinaison est donc nécessaire pour éviter la dispersion de l'infection et mener à une septicémie¹.

2.2.2.2. Activité bactéricide incluant les bactéries dormantes

2.2.2.2.1. Molécules biologiques à spectre total

Alors que certains antibiotiques et certaines stratégies anti-biofilms ciblent le métabolisme bactérien, les bactéries persistantes en état de dormance métabolique sont insensibles à leur action. Il existe des composés anti-biofilms présentant une activité bactéricide efficace sur toutes les populations bactériennes. Par exemple, les peptides antimicrobiens (AMPs) sont une famille de molécules issue de l'immunité innée et participant à la défense de l'organisme contre les infections microbiennes. Plus de 2600 AMPs ont été recensés dans une base de donnée dédiée, appelée APD, dont près de 2200 présentent une activité antibactérienne¹⁵⁹. Ce sont des molécules largement conservées et présentant un spectre d'activité large^{144,160}. Ces AMPs sont capables d'inhiber la formation de biofilms en inhibant l'adhésion bactérienne, l'activité d'enzymes, la synthèse de substances polymériques extracellulaires ou en perturbant le *quorum sensing*¹⁶¹. C'est le cas pour le LL-37, principal AMP humain de la famille des cathélicidines, sur de nombreuses souches bactériennes comme *E. coli*, *S. aureus* ou *P. aeruginosa*^{162,163}. Ces AMPs présentent également des activités bactéricides permettant de cibler l'ensemble des bactéries d'un biofilm en incluant les bactéries dormantes¹⁶⁴. Leurs propriétés cationiques permettent la formation de pores transmembranaires en interagissant avec les composants négatifs de la membrane bactérienne tels que les acides lipotéichoïques, menant à la lyse bactérienne. Ils favorisent aussi la perturbation de la membrane bactérienne par *crossing-over* menant à la floculation des composants intracellulaires¹⁶¹. De nombreux AMPs et dérivés ont été étudiés pour leur capacité à éradiquer un biofilm en s'intéressant spécifiquement aux bactéries persistantes. Malmsten *et al.* ont notamment démontré que l'AMP RRP₉W₄N était capable de tuer les bactéries normales et persistantes de *S. epidermidis* sous forme planctonique et en biofilms *in vitro*¹⁶⁵. D'autres AMPs comme (RW)₄-NH₂ ou (RW)₄D ont également présenté des activités bactéricides élevées contre une souche d'*E. coli* hautement productrice en bactéries persistantes, sous forme planctonique et en biofilms¹⁶⁶.

Cependant, les AMPs peuvent également lier des composants de l'organisme hôte, être séquestrés par des composants de la matrice, être dégradés par des protéases ou les bactéries peuvent développer une résistance adaptée à ces AMPs, réduisant leur performance *in vivo*, en diminuant leur efficacité et en augmentant leur toxicité^{144,161}. Une autre approche pour éradiquer les bactéries dormantes d'un biofilm consiste à stimuler le métabolisme de ces

dernières. Par ajout d'un sucre tel que le mannitol ou le fructose, la glycolyse bactérienne est stimulée et engendre l'augmentation de la force proton motrice, menant à l'augmentation de la pénétration d'aminoglycosides comme la gentamicine dans le cytoplasme bactérien à travers la membrane¹. Cet effet a permis d'augmenter la mortalité de bactéries persistantes d'*E. coli in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'infection du tractus urinaire associée à un cathéter¹⁶⁷.

2.2.2.2. Mesures physiques et chimiques d'éradication des biofilms

Outre les stratégies anti-biofilms de type biologique, il existe également des procédés physiques et chimiques en cours de développement¹⁶⁸. Ils présentent les avantages de ne pas induire et subir de résistance bactérienne et ils possèdent un large spectre d'activité sur tout type de bactéries¹⁶⁸. La photo-inactivation ou thérapie photo-dynamique est par exemple l'une de ces approches physiques où la lumière est utilisée afin de libérer des espèces réactives de l'oxygène, induisant des dommages bactériens mortels. *In vitro*, une exposition de 5 min à de la lumière violet-bleue autour de 380-440 nm sur un biofilm formé de *S. mutans*, souche retrouvée dans les infections buccodentaires, a permis de diminuer significativement la biomasse du biofilm ainsi que la viabilité des bactéries le formant¹⁶⁹. *In vivo*, dans le traitement d'une brûlure infectée par *P. aeruginosa* chez la souris, la lumière violet-bleue a permis d'augmenter le taux de survie des souris de 18% pour celles n'ayant pas suivi de traitement à 100% pour celles l'ayant reçu¹⁷⁰. De plus, aucun dommage de la peau des souris n'a été indiqué pour les doses utilisées. D'autres approches comme les ondes acoustiques et la iontophorèse ont été étudiées pour l'éradication des biofilms en ciblant l'ensemble des bactéries présentes¹. Les effets de la iontophorèse ont été démontrés par Chakravarti *et al.* sur un modèle de cathéter urinaire infecté par un biofilm de *Proteus mirabilis*. Pour cela, un courant électrique traversant des électrodes en argent attachées à des cathéters a été délivré à 9V et 150 μ A dans un modèle de vessie *in vitro*, et de l'urine artificielle chargée en bactéries a été envoyée dans la vessie¹⁷¹. Le nombre de bactéries après traitement a diminué de plus de 50% et le temps avant que les cathéters ne soient bouchés par le biofilm est passé à 156 h contre 22h seulement pour le contrôle non traité.

Des approches visant à cibler chimiquement les bactéries dormantes ont été étudiées¹⁴⁴. Des traitements à base d'agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène sont classiquement utilisés dans le cas d'infections de plaies, tuant les bactéries à travers le phénomène de stress oxydatif décrit précédemment. Dans une étude de Presterl *et al.*, un traitement sur des biofilms de *S. epidermidis* avec du peroxyde d'hydrogène à 5% a mené à une réduction de la biomasse de 75% et de la viabilité bactérienne d'un log de 5 dès 1 min

d'incubation sans toutefois éradiquer complètement les bactéries¹⁷². Dans le cadre d'infections buccodentaires, l'hypochlorite de sodium, un autre agent oxydant, est couramment utilisé. Liu *et al.* ont par exemple évalué l'éradication de biofilms d'*E. faecalis* formés sur de la dentine humaine par de l'hypochlorite de sodium à 5,25%¹⁷³. Les biofilms étaient en état de privation de nutriments puisque ces bactéries sont retrouvées dans cet état métabolique au sein du canal dentaire. Dès les 30 premières secondes de traitement, plus de 50% des bactéries du biofilm ont été tuées. Cependant, même après 30 min de traitement, une fraction résiduelle de bactéries a persisté.

L'impossibilité d'utiliser ces traitements sur de longues durées, à de plus fortes concentrations/temps d'exposition ou pour d'autres applications cliniques pour causes de toxicité cellulaire, en font des freins dans le développement de stratégies anti-biofilms¹⁴⁴.

2.2.2.3. Thérapie à base de bactériophages

La thérapie phagique se positionne comme une stratégie intéressante et une bonne alternative aux antibiotiques puisque les bactériophages présentent une activité antibactérienne à large spectre et sont capables de cibler spécifiquement les bactéries^{174,175}. Ces virus spécifiques des bactéries suivent notamment des cycles lytiques : la libération des bactériophages nouvellement synthétisés s'accompagne d'une lyse cellulaire. Un effet des phages est particulièrement intéressant en thérapie contre les biofilms puisque les bactéries persistantes sont également sensibles aux phages. En effet, Pearl *et al.* ont étudié les effets de persistance sur l'interaction entre *E. coli* et le phage lambda¹⁷⁶. En s'intégrant dans le génome des bactéries persistantes, les phages demeurent inactifs mais lorsque les bactéries sont réactivées, les phages sont surexprimés et poursuivent leur cycle lytique, détruisant les bactéries. Les phages peuvent également exprimer ou induire l'expression d'enzymes de dégradation de la matrice. Ainsi, les polysaccharide depolymerases codées par certains bactériophages telles que des endolysines, des endorhamnosidase ou des alginate lyases peuvent spécifiquement dégrader les exopolysaccharides sécrétés par les bactéries et induire la dégradation de biofilms¹⁷⁷. Hawkins *et al.* ont notamment étudié l'apport d'un traitement à base de bactériophages sur des chiens présentant une otite associée à une infection par *P. aeruginosa*¹⁷⁸. Après avoir injecté une préparation topique de 6 bactériophages dans le canal auditore d'une oreille, le nombre de bactéries viables a diminué de 67%, associé à une augmentation significative de bactériophages prouvant la réplication virale. De plus, aucune inflammation ou effet secondaire local et systémique n'a été relevé durant l'expérience. Plusieurs études ont aussi été réalisées chez l'humain, notamment dans le traitement topique d'infections bactériennes cutanées¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Si certains essais cliniques présentent un bilan

intéressant dans l'efficacité d'un traitement par des bactériophages dans diverses infections cutanées comme le présente la revue de Morozova *et al.*, d'autres études ont un bilan plus mitigé¹⁸¹. Par exemple, des patients atteints de brûlures infectées ont reçu quotidiennement un cocktail de 12 bactériophages anti-*P. aeruginosa* sous forme de crème ou un traitement contrôle standard pendant 7 jours avec 14 jours de suivi¹⁷⁹. L'efficacité du traitement à base de bactériophages était insuffisante pour les 12 patients infectés ayant reçu le traitement thérapeutique, l'essai clinique a alors été stoppé. Trois d'entre eux ont également présenté des effets secondaires.

La thérapie phagique s'inscrit donc dans un processus thérapeutique alternatif intéressant tant pour la lutte contre les biofilms que les bactéries résistantes aux antibiotiques. Cependant, plusieurs limites sont associées à l'utilisation de phages cliniquement¹⁷⁵. Leur activité est réduite dans l'organisme face à la prise en charge par le système immunitaire. De possibles émergences de résistances bactériennes aux bactériophages sont susceptibles d'apparaître, et les phages peuvent également contribuer au développement de résistances aux antibiotiques. Enfin, la formulation et la stabilisation des préparations pharmaceutiques à base de bactériophages est également un challenge^{168,175}.

2.2.3. Combinaisons thérapeutiques multi-cibles

L'ensemble des stratégies thérapeutiques décrites précédemment présente des avantages et des résultats intéressants pour lutter contre les biofilms bactériens. Cependant, seules, elles peuvent atteindre diverses limites dans l'éradication complète d'un biofilm. La combinaison thérapeutique est une approche permettant de multiplier les cibles et les mécanismes d'inhibition dans un biofilm dont l'environnement est hétérogène, où des effets synergiques entre molécules peuvent être obtenus tout en limitant leur toxicité et la probabilité d'apparition de résistances¹⁸².

La connaissance actuelle et développée sur les biofilms, tant sur l'aspect fondamental que sur les différentes stratégies d'inhibition, conduit à revoir l'utilisation clinique des antibiotiques. Par exemple, alors que les bactéries se retrouvent protégées dans la matrice qui agit comme barrière physique, différentes combinaisons d'antibiotiques avec des enzymes de dégradation de la matrice ont été évaluées. L'utilisation d'une métalloprotéase a notamment permis de dégrader la matrice de biofilms de *S. aureus* et d'augmenter l'accessibilité de la kanamycine dans des biofilms *in vitro*, en tuant plus de bactéries que lorsqu'elle était utilisée seule¹⁸³. Egalement, la combinaison entre la DNase I capable de

dégrader la matrice de multiples biofilms (*S. aureus*, *E. coli* ou encore *P. aeruginosa*) et certains antibiotiques comme la rifampicine, la levofloxacine ou l'ampicilline a permis d'augmenter l'activité bactéricide de ces derniers¹⁵⁶. D'autres stratégies combinatoires entre antibiotiques et agents anti-biofilms comme les peptides antimicrobiens ont été évaluées pour leur complémentarité d'action dans la lutte contre les biofilms, permettant de potentialiser leurs activités^{157,184-186}.

Cliniquement, les biofilms sont également multi-espèces et peu d'études ont évalué l'efficacité de stratégies thérapeutiques sur de tels biofilms¹⁸⁷. Face à la diversité génétique et cellulaire des souches bactériennes, la combinaison thérapeutique offre la capacité d'élargir le spectre d'activité antibactérien, ciblant ainsi plusieurs populations au sein d'un même biofilm.

2.3. Développement clinique et industriel limité

Trouver une stratégie clinique efficace dans le contrôle et l'éradication de biofilms représente un réel challenge. Le développement de nouveaux antibiotiques comme de thérapies anti-biofilms innovantes présente non seulement des freins cliniques mais également industriels et économiques.

2.3.1. Nouveaux antibiotiques

De nouveaux antibiotiques, plus adaptés à une action contre les bactéries sous forme de biofilms pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Néanmoins, le contexte économique peu attractif dans ce domaine limite les investissements¹⁸⁸. Parmi les 18 plus importantes compagnies pharmaceutiques, 15 ont abandonné le domaine des antibiotiques¹⁸⁹. Notamment, les industriels se sont réorientés sur des pathologies chroniques incurables comme l'asthme, le diabète ou diverses maladies psychiatriques. Il a par exemple été estimé qu'un nouvel antibiotique engendrait un bénéfice de 50 millions \$ contre 1 milliard \$ pour le traitement d'une maladie neuromusculaire.

Cette différence s'explique par l'apparition de résistances bactériennes dans les dix ans suivant la mise sur le marché d'un antibiotique, limitant rapidement son usage (Figure 22). Aussi, les antibiotiques récemment mis sur le marché sont généralement mis de côté par les médecins et réservés comme traitement de dernier recours lorsqu'une infection présente des résistances aux antibiotiques plus classiques, menant à une sous-utilisation des nouveaux antibiotiques et à un faible retour sur investissement, à court et long terme, pour les entreprises¹⁸⁹. En terme de réglementation, l'évaluation et l'approbation de nouveaux

antibiotiques s'est également durcie au cours des années par des agences réglementaires comme l'*US Food and Drug Administration* (FDA), résultant dans un nombre limité d'essais cliniques et de nouvelles molécules commercialisées¹⁸⁹.

Antibiotic deployment	Years	Antibiotic resistance observed
Sulfonamides	Before 1935 1936–1940	
B-lactams (penicillin)	1941–1945	Sulfonamides
Streptomycin		
Chloramphenicol	1946–1950	B-lactams (penicillin)
Tetracyclines		
Colistin		
Macrolides (erythromycin)	1951–1955	Tetracyclines
Glycopeptides (vancomycin)	1956–1960	Streptomycin Chloramphenicol Colistin
Cephalosporins	1961–1965	
Quinolones (nalidixic acid)	1966–1970	Cephalosporins Quinolones (nalidixic acid)
	1971–1975	
	1976–1980	
	1981–1985	
	1986–1990	Macrolides (erythromycin) Glycopeptides (vancomycin)
	1991–1995	
Oxazolidinones (linezolid)	1996–2000	
	2001–2005	Oxazolidinones (linezolid)
	2006–2010	Oxazolidinones (linezolid)
'New antimicrobial peptides'	2011-beyond	???

Figure 22. Relation temporelle entre l'introduction des antibiotiques en clinique et l'apparition de résistances (d'après Sierra *et al.*¹⁹⁰)

2.3.2. Thérapies anti-biofilms innovantes

Un faible nombre des stratégies anti-biofilms développées depuis quelques décennies, et décrites dans ce chapitre, ont été testées chez l'humain¹⁴⁴. Alors qu'elles sont très efficaces *in vitro* et *in vivo*, différents paramètres cliniques et industriels freinent leur développement.

Actuellement, une vingtaine d'AMPs seulement parmi les 2600 recensés dans la base de données APD se trouvent en développement, allant des essais précliniques aux essais cliniques de phase III, pour des applications diverses mais principalement topiques (Figure 23)¹⁹⁰. Certains AMPs sont déjà approuvés par la FDA en tant qu'antibiotiques, comme la daptomycine, la teicoplanine ou la vancomycine¹⁶⁰. Hormis ces quelques exceptions, les AMPs font face à des effets indésirables sévères comme la toxicité cellulaire, l'immunogénicité, l'émergence de résistances bactériennes ou une activité hémolytique, limitant leur développement clinique¹⁶⁰. Egalement, ils présentent généralement une demi-vie courte dans la circulation ainsi qu'une efficacité mitigée par rapport aux études *in vitro*¹⁹¹. Enfin, la synthèse peptidique est un processus relativement onéreux et long, constituant un frein pour une éventuelle production industrielle¹⁴⁴.

Compound name	Mechanism of action	Indications	Development stage	Company (reference)
Surotomycin	Membrane disruptor, depolarization	<i>C. difficile</i> -associated diarrhea	Phase III	Merck-Cubist
POL7080	LptD binding	VABP, bronchiectasis	Phase II	Polyphor
Pexiganan (Locilex), MSI 80	Disruption of bacterial cell membrane	Skin and skin structure infections	Evaluating development	Dipexium
Omiganan (CLS001)	Cytoplasmatic membrane depolarization	Rosacea, Acne, atopic dermatitis, vulvar intraepithelial neoplasia	Phase III Phase II	Cutanea Life Sciences
SGX 942	Innate defense regulator	Oral mucositis in head and neck cancer	Phase II	Soligenix
LTX-109 (Lytixar)	Membrane disruptor (cell lysis)	Diabetic foot and skin infections impetigo	Phase I/II	Lytix Biopharma
Brilacidin	Bacterial cell membrane disruptor	ABSSSI Infections Oral mucositis	Phase III Phase II	Cellceutix
C16G2	Membrane disruptor	Dental caries, anticavity	Phase II	C3 Jian
HB1345	Lipoteichoic acid binding, presumably membrane disruptor	Skin infections, acne	Preclinical	Helix BioMedix
AA-139	Membrane disruptor	MDR cUTI, pneumonia	Preclinical	Adenium Biotec
OG253 and OG716	Possibly by inhibition of cell wall biosynthesis, pore formation	<i>Clostridium difficile</i> infection in enteritis	Pre-investigational new drug (pre-IND)	Oragenics
NVB333	Inhibition of cell wall biosynthesis	Gram-positive caused infections	Drug candidate, preclinical	Cantab Anti-infectives
NP213 (Novexatin)	Membrane disruption	Antifungal, onychomycosis	Phase IIa	NovaBiotics
NP339 (Novamycin)	Membrane perturbation	Yeast, mould infections	Preclinical	NovaBiotics
P113	Possible surface-active agents, induce ATP release, activity on mitochondria	Gingivitis, oral candidiasis	Phase II	Pacgen

Figure 23. Pipeline des différents AMPs en cours d'évaluation clinique (adapté de Sierra *et al.*¹⁹⁰)

Au niveau des enzymes de dégradation de la matrice, la Dornase alfa (Pulmozyme®) est actuellement l'unique traitement sur le marché qui présente une activité anti-biofilm¹⁵³. Il s'agit d'une DNase recombinante humaine qui a été approuvée par la FDA en 1993 pour le traitement de la mucoviscidose¹⁹² afin de fluidifier le mucus pulmonaire fortement concentré en ADN et favoriser son expectoration. Elle peut par ailleurs altérer l'infection bactérienne en dégradant l'ADNe dans les biofilms pulmonaires, rendant les bactéries plus sensibles à l'action d'un antibiotique^{192,193}.

Les inhibiteurs du *quorum sensing* font l'objet de nombreux dépôts de brevets ces dernières années¹⁹⁴, mais des essais cliniques doivent encore être menés pour évaluer leur efficacité chez l'humain.

Une multitude de stratégies anti-biofilms prometteuses aux modes d'action divers sont en cours de développement depuis ces dernières décennies mais très peu ont atteint et validé des essais cliniques. Face aux limites rencontrées dans le développement de ces thérapies anti-biofilms, d'autres solutions s'offrent pour contrer les phénomènes de récalcitrance des bactéries comme l'utilisation de systèmes de délivrance d'antibiotiques.

3. LES SYSTEMES DE DELIVRANCE D'ANTIBIOTIQUES

3.1. Systèmes de délivrance de principes actifs

3.1.1. Généralités

Ces dernières décennies, la nanotechnologie s'est extrêmement développée dans le monde de la science, affectant la vie de millions de patients. Particulièrement, les systèmes de délivrance de principes actifs se positionnent comme un outil pharmacologique incontournable pour la formulation et la délivrance de molécules à visée thérapeutique. Alors qu'un principe actif présente des propriétés pharmacologiques d'intérêt sur un organisme, ses effets biologiques dépendent de la capacité de la molécule à fixer son récepteur spécifique, en terme de quantité mais également en terme de localisation au site d'action désiré. Un système de délivrance peut délivrer la molécule dans l'espace, en promouvant sa pénétration et en ciblant de manière spécifique ou non le tissu d'intérêt, et dans le temps, en allongeant sa durée de vie dans l'organisme et en contrôlant sa libération¹⁹⁵. Il permet également d'augmenter la solubilité de molécules hydrophobes.

Basée sur une combinaison de billes recouvertes de cire et de graisse (pour une libération progressive) et de billes sans revêtement (pour une libération immédiate), Spansule® fut en 1952 le premier système à contrôler la cinétique de libération d'un principe actif, la dextroamphétamine, sur 12h. Ce système permettait la prise en charge des troubles de l'attention et de la narcolepsie, limitant la prise du traitement à 2 fois par jour^{196,197}. Réelle révolution dans la formulation des traitements thérapeutiques, il a ouvert la voie au développement et à la caractérisation de nouvelles technologies¹⁹⁸. Depuis, les systèmes de délivrance se sont diversifiés avec le développement d'hydrogels, de particules biodégradables polymériques (mise sur le marché de Lupron Depot® en 1989) et lipidiques (Doxil®, 1995) ou de revêtements de dispositifs médicaux¹⁹⁹⁻²⁰¹.

3.1.2. Principaux vecteurs particuliers

De nombreux matériaux sont utilisés pour préparer des systèmes de délivrance de principes actifs qui peuvent être classés en fonction de leur composition (Figure 24)²⁰². Concernant les systèmes à base de matériaux inorganiques, les nanoparticules métalliques sont principalement développées. Elles présentent un double intérêt car elles peuvent être fonctionnalisées en surface pour la délivrance de molécules d'intérêt et elles possèdent des propriétés antibactériennes intrinsèques. Cependant, l'objet de cette thèse porte plus

précisément sur les vecteurs à base de matériaux biodégradables. On distingue les systèmes à base de lipides comme les liposomes, de ceux à base de polymère comme les nanoparticules.

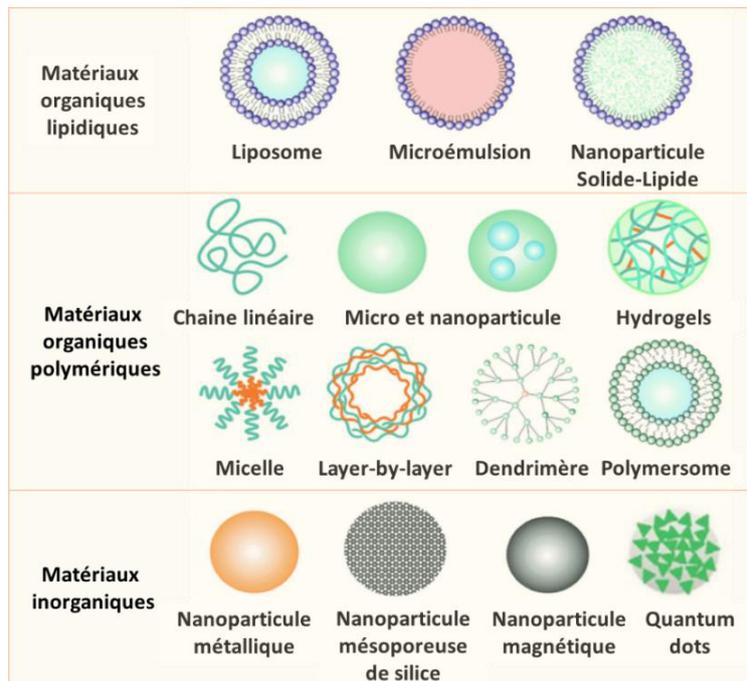


Figure 24. Classification des systèmes de délivrance de principes actifs selon leur composition (adapté de Mahato *et al.*²⁰²)

3.1.2.1. Liposomes

Parmi les vecteurs organiques lipidiques, les liposomes sont la classe la plus développée dans les systèmes de délivrance, notamment dans les applications biofilms²⁰³. D'un diamètre allant de 20 nm à 10 µm, ils sont composés d'une ou plusieurs bicouches lipidiques à base de phospholipides, cholestérol ou autres lipides dans lesquels se trouve un cœur aqueux²⁰². On parle de liposomes unilamellaires, multilamellaires ou oligolamellaires. Il existe de nombreuses méthodes pour synthétiser des liposomes comme l'hydratation de film lipidique, l'extrusion, la micro-émulsification ou plus récemment par microfluidique^{204,205}.

Les liposomes présentent de nombreux avantages comme leur capacité à vectoriser des molécules de nature différente. En effet, grâce à leur caractère amphiphile, les liposomes peuvent vectoriser des molécules hydrophiles chargées dans l'espace aqueux interne, ou des molécules hydrophobes piégées à travers la couche de lipides (Figure 25)²⁰⁶. Ils sont dotés d'une excellente capacité à pénétrer et diffuser à travers les barrières et tissus pour atteindre leur cible. D'ailleurs, la surface des liposomes peut être fonctionnalisée par des ligands pour augmenter leur spécificité cellulaire. De nombreux types de molécules peuvent être ajoutées

comme des anticorps, des protéines ou des sucres. Ils peuvent également être fusogéniques, c'est-à-dire qu'ils présentent la capacité de fusionner avec les membranes cellulaires et notamment bactériennes, délivrant directement les antibiotiques ou autres molécules encapsulées à l'intérieur de la cellule. Les liposomes, grâce à leur composition en lipides similaire à celle de cellules eucaryotes, sont également biodégradables et biocompatibles²⁰⁶.

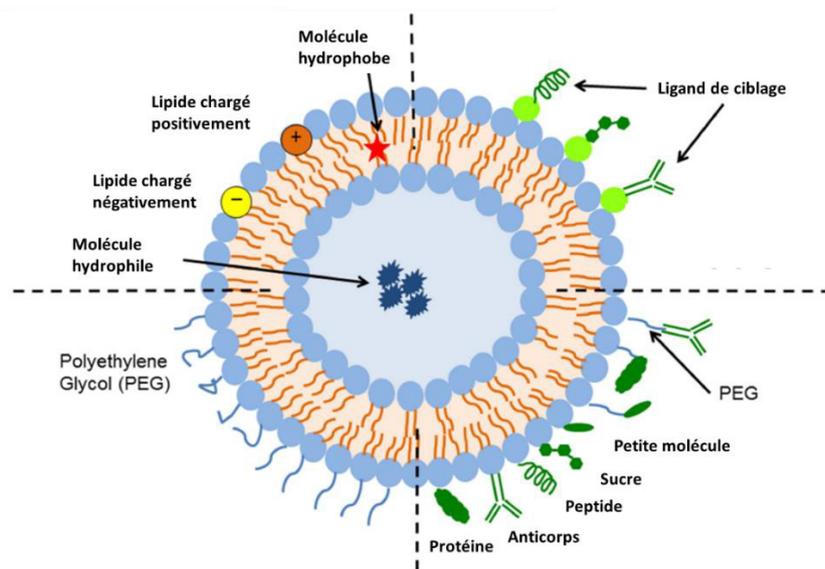


Figure 25. Structure et composition d'un liposome fonctionnalisé (adapté de Sercombe *et al.*²⁰⁶)

Cependant, les liposomes sont assez peu stables physiquement, sous l'effet de la température par exemple, et chimiquement, par hydrolyse de leurs liaisons esters ou par oxydation de leurs chaînes acyls, limitant leur capacité de stockage en solution et les rendant sujets à une dégradation relativement rapide dans l'organisme. Il est toutefois possible de les fonctionnaliser en surface par des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) pour limiter leur clairance par l'organisme²⁰⁶. Leur faible capacité d'encapsulation de molécules est également un frein à leur utilisation pour des applications biofilms où de fortes concentrations d'antibiotiques sont requises pour ne pas entraîner l'apparition des phénomènes de récalcitrance décrits précédemment²⁰³.

3.1.2.2. Nanoparticules polymériques

Parmi les vecteurs organiques polymériques, les particules constituent l'outil le plus étudié devant les micelles et les dendrimères²⁰³. Les microparticules sont des systèmes colloïdaux sphériques solides avec des tailles allant de 1 à 100 μm tandis que les

nanoparticules ont des tailles allant de 1 à 200 nm pour des applications biomédicales²⁰². D'un point de vue réglementaire, l'Europe a défini les nanoparticules comme des objets dont la moitié, en nombre, a une taille inférieure à 100 nm. Elles peuvent être synthétisées à partir de polymères naturels comme le chitosane, l'alginate ou l'acide hyaluronique, mais également à partir de polymères synthétiques biodégradables comme l'acide poly-lactique co-glycolique (PLGA) ou l'acide poly-lactique (PLA) qui sera utilisé lors de ces travaux de thèse²⁰³.

Les procédés de synthèse des particules à base de PLGA ou de PLA sont variés comme la simple ou la double émulsion, la nanoprécipitation, la microfluidique ou encore le *spray drying*^{207,208}. Dépendamment de la méthode de synthèse utilisée, des molécules de nature différente peuvent être vectorisées. Par exemple, des molécules hydrophobes peuvent être encapsulées lors d'une émulsion simple type huile dans eau, et des molécules hydrophiles lors d'une double émulsion eau dans huile dans eau. Les particules peuvent également être fonctionnalisées en surface par ajout de molécules comme des ligands de ciblage ou des molécules thérapeutiques. Les vecteurs polymériques sont généralement plus stables que les liposomes²⁰³. De plus, leur capacité d'encapsulation peut atteindre des rendements élevés. En revanche, tout comme les liposomes, les nanoparticules peuvent induire des réponses immunitaires indésirables puisqu'elles sont sujettes à l'opsonisation et à la prise en charge par le système réticulo-endothélial²⁰⁹.

3.2. Apport des systèmes de délivrance dans la lutte anti-biofilm

3.2.1. Divers avantages à la vectorisation d'antibiotiques

Dotés d'une activité antibactérienne, les agents bactéricides comme les antibiotiques sont indispensables pour éradiquer les « pièces maitresses » d'un biofilm. Le recours à des systèmes de délivrance d'antibiotiques dans des biofilms permettrait de surmonter les problèmes de faible biodisponibilité que nous avons décrits précédemment. De plus, à travers leur reformulation avec des systèmes de délivrance, le repositionnement de molécules antibiotiques déjà commercialisées, dont la sécurité sanitaire est connue et documentée depuis des décennies, est une stratégie permettant le développement rapide de nouveaux traitements.

Ces vecteurs peuvent augmenter la biodisponibilité de l'antibiotique à travers sa protection contre la dégradation après administration et l'amélioration de sa biodistribution. Ils sont également capables de pénétrer dans des biofilms, de cibler les bactéries et même de

fusionner avec leurs membranes pour les liposomes, délivrant l'antibiotique au plus proche de son site d'action. Ils peuvent prolonger sa libération, permettant de limiter le nombre d'administrations (Figure 26)²¹⁰.

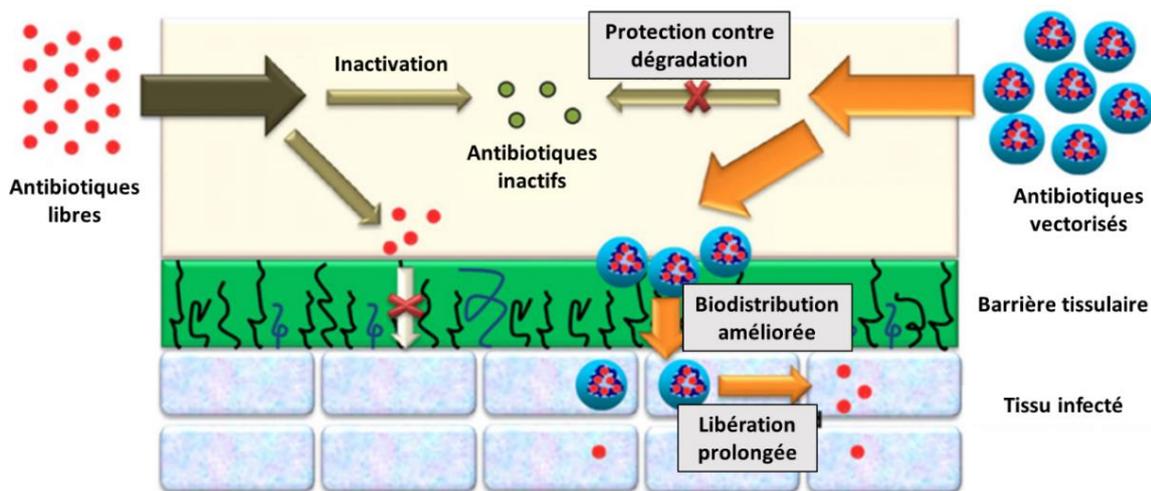


Figure 26. Mécanismes des nanoparticules pour améliorer la délivrance d'un antibiotique (adapté de Xiong *et al.*²¹⁰)

3.2.1.1. Protection contre les dégradations

Les systèmes de délivrance peuvent protéger l'antibiotique encapsulé des dégradations enzymatiques ou acidobasiques provenant du biofilm ou de l'organisme hôte, et ainsi potentiellement améliorer les paramètres de PD/PK de l'antibiotique¹⁹⁵. Une étude menée par Nacucchio *et al.* a ainsi mis en évidence que la piperacilline était protégée de la dégradation par une β -lactamase de staphylocoque lorsqu'elle était chargée dans des liposomes uni-lamellaires constitués de phosphatidylcholine (PC) et de cholestérol²¹¹. Cette protection a permis à l'antibiotique d'inhiber la croissance de *S. aureus* planctonique contrairement à la molécule seule en présence de β -lactamase *in vitro*. Une autre étude a permis d'évaluer l'impact de nano-complexes constitués d'acide poly-maléique anhydride-*alt*-octadécène sur la protection de l'ampicilline contre une dégradation enzymatique²¹². Après action de la β -lactamase, l'ampicilline était significativement moins dégradée lorsqu'elle était formulée dans les nano-complexes, entraînant une activité antibactérienne accrue contre *S. aureus in vitro*. Un effet similaire a également été observé en conditions acides, suggérant la protection des antibiotiques dans la matrice relativement acide des biofilms²¹².

3.2.1.2. Biodistribution améliorée

Les systèmes de délivrance sont capables d'augmenter la biodisponibilité d'un antibiotique dans l'organisme en améliorant sa pénétration à travers les différentes barrières ou tissus comme ceux du système digestif, du système pulmonaire ou la peau^{213,214}. Par exemple, la vancomycine présente une très faible absorption à travers l'intestin, rendant impossible son utilisation par voie orale et nécessitant de l'administrer en intraveineuse. Uhl *et al.* ont développés une formulation liposomale à base de vancomycine et se sont intéressés à évaluer son administration orale par gavage sur un modèle de rat sain²¹⁵. La formulation de la vancomycine dans des liposomes a permis d'augmenter sa biodisponibilité dans le sang de manière significative 1h après administration par rapport à l'antibiotique libre.

3.2.1.3. Pénétration dans les biofilms

Alors que certains antibiotiques ne peuvent pas atteindre les bactéries d'un biofilm à cause de la barrière physique constituée par la matrice, les vecteurs de principes actifs présentent la capacité de pénétrer dans des biofilms²¹⁶. Liu *et al.* ont développé des nanomicelles d'une centaine de nanomètres à partir d'un mélange de poly(éthylène glycol)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) et de poly(ϵ -caprolactone)-*block*-poly(β -amino ester) encapsulant du triclosan²¹⁷. Ces vecteurs étaient capables de pénétrer dans les zones les plus profondes d'un biofilm de *S. aureus* malgré une diffusion hétérogène (Figure 27). De plus, l'activité bactéricide de l'antibiotique était augmentée par rapport à la molécule seule *in vitro*.

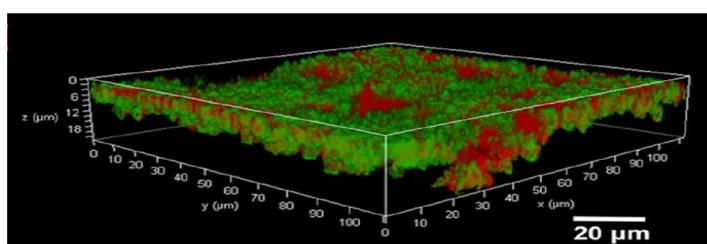


Figure 27. Pénétration de nanomicelles marquées fluorescentes (rouge) dans un biofilm de *S. aureus* (vert), observée par microscopie confocale (adapté de Liu *et al.*²¹⁷)

3.2.1.4. Ciblage des bactéries

Les systèmes de délivrance peuvent être fonctionnalisés en surface par des ligands afin de cibler et promouvoir un contact proche avec les bactéries d'un biofilm, et ainsi délivrer l'antibiotique encapsulé au plus proche de sa cible¹⁹⁵. Par exemple, une formulation

liposomale a été développée par Robinson *et al.* en incorporant de la chlorhexidine et du triclosan dans des liposomes constitués de dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) et DPPC²¹⁸. Des anticorps anti-*Streptococcus oralis* obtenus à partir d'un récepteur agglutinine présent sur la surface cellulaire de *S. oralis* ont ensuite été conjugués à la surface des liposomes. Un test ELISA a été réalisé pour évaluer l'affinité de l'anticorps anti-*S. oralis* avec diverses bactéries comme *Streptococcus gordonii*, *S. salivarius* et *S. mutans*, où l'anticorps s'est lié uniquement à *S. oralis*²¹⁸. Par ailleurs, les liposomes sans anticorps interagissaient significativement moins avec *S. oralis* que lorsque l'anticorps était présent à leur surface. Dans une autre étude menée par les mêmes auteurs, les immunoliposomes développés ont permis d'inhiber la formation de biofilms de *S. oralis* plus rapidement et à des concentrations plus faibles par rapport aux antibiotiques seuls. De plus, les immunoliposomes n'étaient pas plus efficaces que les antibiotiques seuls sur d'autres biofilms tels que *S. gordonii* ou *S. salivarius*, indiquant que le ciblage de l'anticorps est spécifique pour *S. oralis*²¹⁹.

3.2.1.5. Fusion avec les membranes bactériennes

Les liposomes présentent un avantage conséquent dans la délivrance d'antibiotiques contrairement aux autres classes de vecteurs. Ils peuvent être fusogéniques et déstabiliser les membranes biologiques par fusion, créant des pores et délivrant la molécule qu'ils contiennent directement dans le cytoplasme de la bactérie²²⁰. Alors que certains antibiotiques, comme les glycopeptides, sont inactifs contre les bactéries à Gram négatif à cause de leur incapacité à traverser leur membrane externe, l'utilisation de liposomes fusogéniques peut contourner cette limitation et élargir le spectre de ces antibiotiques¹⁹⁵. Nicolosi *et al.* ont par exemple développé des liposomes unilamellaires capables d'adhérer et fusionner avec la membrane externe d'*E. coli*²²¹. Contrairement à la vancomycine seule ou chargée dans des liposomes non fusogéniques, le chargement de l'antibiotique dans les liposomes fusogéniques a permis d'induire une activité antibactérienne contre *E. coli* et *Acinetobacter baumannii*. Fluidosomes™ (Axentis Pharma), un traitement à base de liposomes fusogéniques composés des phospholipides DPPC et dimiristoylphosphatidylglycerol (DMPG), a d'ailleurs atteint des essais cliniques de phase II dans les années 2000 pour le traitement des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

3.2.1.6. Libération prolongée d'antibiotiques

L'utilisation clinique des antibiotiques se base sur une stratégie agressive, nécessitant de fortes doses maintenues par des administrations fréquentes et sur de longues durées. La

libération prolongée d'un antibiotique dans un biofilm par un vecteur permet non seulement un temps de contact prolongé entre le biofilm et l'agent antimicrobien augmentant l'effet de ce dernier, mais également de limiter la fréquence d'administration et les problèmes de toxicité associés aux antibiotiques^{195,210,222}. Par exemple, des nanoparticules de PLGA ont libéré progressivement de la gentamicine sur 16 jours *in vitro* et la formulation a permis de réduire drastiquement la charge bactérienne de biofilms de *P. aeruginosa* par rapport à l'antibiotique seul²²³. Sur un modèle murin d'infection péritonéale par *P. aeruginosa*, alors que l'antibiotique seul a permis de réduire la charge bactérienne pendant 48h, la formulation particulière était toujours efficace 96h après injection²²³.

Cette libération prolongée peut également être intéressante en prévention d'une infection bactérienne, notamment dans le cas d'opérations chirurgicales visant à poser un dispositif médical¹⁹⁵. Une formulation d'oxacilline à base de liposomes et d'un conjugué cholestérol alendronate-tri(éthylène glycol) a été développée par l'équipe du Dr Wang à l'université du Nebraska²²⁴. Elle a démontré sa capacité à se fixer rapidement à de l'hydroxyapatite, matériau couramment utilisé pour les prothèses orthopédiques, suggérant la possibilité d'imprégner un dispositif juste avant chirurgie avec une telle formulation. Les liposomes ont également entraîné la libération progressive de l'oxacilline sur 6h et ont inhibé l'adhésion de *S. aureus* sur l'hydroxyapatite.

En ayant un impact significatif à toutes les étapes de délivrance d'un antibiotique, de son injection dans un organisme à l'atteinte de sa cible, et en prolongeant son effet dans la durée, les systèmes de délivrance sont un outil précieux pour contourner les problèmes rencontrés par les antibiotiques dans l'éradication des biofilms bactériens.

3.2.2. Combinaisons et co-délivrance d'antibiotiques et d'agents anti-biofilms

L'utilisation de systèmes de délivrance d'antibiotiques dans la lutte anti-biofilm peut être complétée et améliorée avec l'ajout d'agents anti-biofilms ou d'autres antibiotiques. En effet, alors que les combinaisons thérapeutiques présentées en § 2.2.3 permettent d'intervenir à des niveaux différents sur le biofilm en multipliant les modes d'action, l'utilisation de vecteurs en combinaison ou pour la co-délivrance de ces principes actifs semble être une stratégie remarquable pour potentialiser leurs effets dans l'éradication de biofilms²¹⁴.

La co-délivrance entre un antibiotique encapsulé dans des particules et une enzyme de dégradation de la matrice montre un intérêt grandissant ces dernières années, permettant à l'antibiotique de mieux pénétrer dans un biofilm et atteindre les bactéries les plus profondes^{195,225–229}. En 2015, Baelo *et al.* ont développé une formulation à base de nanoparticules de PLGA encapsulant de la ciprofloxacine et fonctionnalisées en surface par de la DNase I²²⁶. Par rapport aux nanoparticules encapsulant de la ciprofloxacine seulement, la fonctionnalisation de la DNase I sur les nanoparticules a permis d'éradiquer plus fortement et plus rapidement des biofilms de *P. aeruginosa in vitro*, suggérant que l'activité de dégradation de la matrice par la DNase I permettait aux particules de délivrer la ciprofloxacine plus efficacement aux bactéries du biofilm. De même, Tasia *et al.* ont très récemment développé une formulation à base de nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN) chargée avec des nanoparticules d'argent et de la DNase I pour le traitement de biofilms d'*E. coli* et de *S. mutans*²²⁷. L'effet anti-biofilm des nanoparticules d'argent délivrées par les nanoparticules mésoporeuses de silice a été augmenté contre les deux types de biofilms grâce à la dispersion de la biomasse des biofilms par la DNase I *in vitro* (Figure 28).

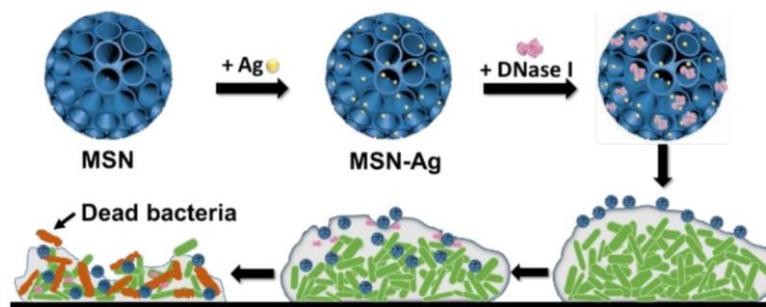


Figure 28. Illustration de la formulation développée par Tasia *et al.* et son effet sur des biofilms (d'après Tasia *et al.*²²⁷)

L'apport de la DNase I dans le traitement de nanoparticules chargées en antibiotiques a également été démontré récemment *in vivo* sur un modèle de brûlure infectée chez le rat²²⁸. Un gel de chitosane chargé avec des nanoparticules lipidiques solides encapsulant de la sulfadiazine a été supplémenté avec de la DNase I et a permis de guérir complètement la plaie après 21 jours contrairement aux traitements sans DNase I (Figure 29). L'effet de nanoparticules polymériques encapsulant de la tobramycine et fonctionnalisées par de la dornase alfa (Pulmozyme®), DNase recombinante humaine commercialisée pour le traitement de la mucoviscidose (§ 2.3.2), a été évalué pour l'éradication des infections bactériennes associées à cette pathologie²²⁹. Les particules fonctionnalisées par la dornase alfa ont démontré une meilleure pénétration dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose ainsi qu'une meilleure efficacité dans l'éradication des biofilms de *P.*

aeruginosa présents dans ces expectorations, par rapport aux particules encapsulant de la tobramycine seule ou supplémentée par de la dornase alfa en solution.



Figure 29. Etat de guérison de la brûlure infectée de rats après 21 jours de traitement (adapté de Patel *et al.*²²⁸)

3.3. Optimisation des propriétés physicochimiques des systèmes de délivrance

Les propriétés physicochimiques des systèmes de délivrance jouent un rôle crucial dans leur comportement avec les biofilms bactériens, que ce soit pour leur transport, leur interaction, leur pénétration et leur rétention dans ces biofilms²³⁰. Il est donc nécessaire d'optimiser le design de ces vecteurs pour que leur fonctionnalité soit optimale dans la délivrance des antibiotiques qu'ils contiennent. Trois aspects sont déterminants dans ce design : la composition, la taille et la surface de ces vecteurs particuliers²²⁰.

3.3.1. Composition appropriée au microenvironnement des biofilms

La libération du contenu des vecteurs est un point clé dans l'efficacité anti-biofilm. Certaines formulations sont dites *smart* ou *responsive* et se basent sur une composition spécifique permettant de libérer leur contenu sous l'impulsion de stimuli internes comme le pH, la présence d'enzymes ou de sucres, ou par des stimuli externes comme la température ou la lumière^{217,231-233}. Un exemple typique pour une application biofilm est celui du pH ou des enzymes. Comme les biofilms bactériens peuvent atteindre un environnement relativement acide proche de 5 et que la matrice est composée d'une multitude d'enzymes bactériennes, l'utilisation d'un tel système permettrait de délivrer les molécules actives principalement au niveau du site d'infection. Chen *et al.* ont récemment développé des

micelles hybrides à partir de deux co-polymères amphiphiliques à base de résidus poly-aspartamides et contenant de l'azithromycine²³⁴. Elles ont ensuite été fonctionnalisées en surface avec une seconde molécule active, la *cis*-aconityl-D-tyrosine. Sous l'effet d'une diminution du pH de 7.4 à 5.5, la tyrosine est libérée des micelles et est capable de disperser la matrice du biofilm (Figure 30). Les micelles subissent alors une diminution de leur diamètre et leur charge de surface est inversée, permettant de mieux pénétrer le biofilm et d'interagir avec les parois bactériennes. Sous l'action d'une lipase, les micelles sont alors désintégrées, libérant leur contenu en azithromycine au plus proche des bactéries du biofilm²³⁴.

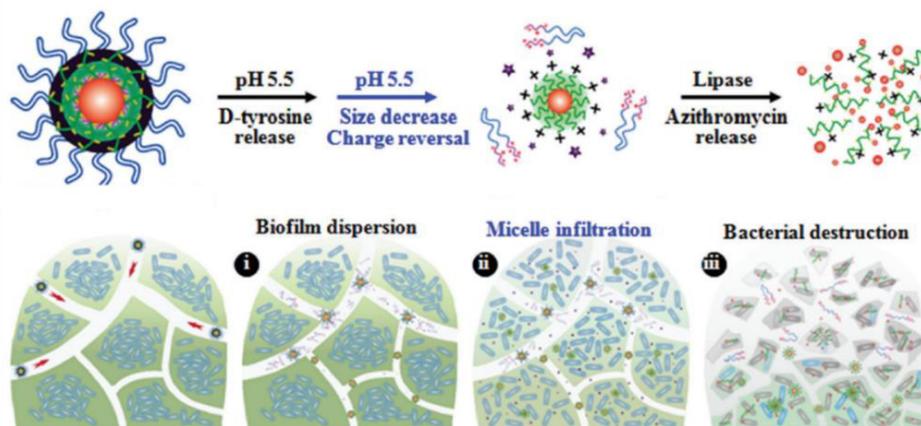


Figure 30. Principe des micelles sensibles au pH acide et aux lipases développées par Chen *et al.* (adapté de Chen *et al.*²³⁴)

3.3.2. Taille adaptée à la pénétration des biofilms

La taille des systèmes de délivrance est un paramètre essentiel pour que ces derniers pénètrent efficacement et que les antibiotiques qu'ils contiennent atteignent les bactéries dans l'ensemble d'un biofilm. Afin de pénétrer au sein d'un biofilm, le diamètre des vecteurs ne doit pas dépasser les dimensions des canaux d'eau par lesquels ils circulent, variant d'une dizaine de nanomètres à quelques microns pour les plus grands²²⁰. Des particules de polystyrène et des liposomes d'un diamètre allant jusqu'à 130 nm ont notamment démontré une capacité maximale de pénétration au sein de biofilms de *P. aeruginosa* et de *Burkholderia multivorians* d'après une étude réalisée par Forier *et al.* avec des vecteurs allant de 3 à 550 nm²³⁵. En revanche, seulement les particules d'un diamètre inférieur à 50 nm sont capables de pénétrer à l'intérieur des bactéries à travers leur paroi, comme c'est le cas des nanoparticules métalliques²²².

Ce cut-off de taille pour la pénétration de vecteurs dans les biofilms a également été confirmé récemment dans une revue de Liu *et al.*, ajoutant qu'avec des particules de 130 nm, elles peuvent circuler plus longtemps dans l'organisme avant leur clairance²²⁰. Les particules

d'un diamètre inférieur à 5 nm, en revanche, sont rapidement prises en charge de façon aspécifique par l'organisme hôte et peuvent facilement pénétrer dans les tissus, produisant des espèces réactives de l'oxygène et entraînant la mort cellulaire. Concernant les particules d'un diamètre supérieur à 500 nm, elles peuvent rapidement activer le système du complément et être opsonisées. Liu *et al.* ont alors conclu qu'un diamètre de particules autour de 100-200 nm était optimal pour le contrôle des infections à biofilms²²⁰. La revue récemment publiée par Rizvi *et al.* a également confirmé ces dimensions²¹³.

3.3.3. Surface optimisée pour l'accumulation dans les biofilms

Les propriétés de surface des systèmes de délivrance sont un paramètre clé pour optimiser la délivrance d'un antibiotique. Contrairement aux moyens de ciblage spécifique présentés en § 3.2.1.4 par fonctionnalisation de la surface à l'aide d'anticorps, les propriétés physico-chimiques de surface des vecteurs peuvent permettre un ciblage passif¹⁹⁵. Les liposomes et les nanoparticules cationiques peuvent, à travers des interactions électrostatiques, cibler de manière passive la membrane chargée négativement des bactéries ou les macromolécules anioniques de la matrice des biofilms comme des polysaccharides et l'ADNe^{195,222}. Radovic-Moreno *et al.* ont par exemple développé des nanoparticules de PLGA fonctionnalisées avec du PEG et un peptide cationique, la polyhistidine, capables d'interagir avec des bactéries de type *S. aureus* et *E. coli*⁵¹. Les vecteurs peuvent alors s'accumuler et être retenus dans le biofilm malgré des lavages comme cela a été démontré par Rozembaum *et al.* à l'aide de dendrons présentant des groupements amines NH_3^+ dans des biofilms de *P. aeruginosa*²³⁶. Prolongeant leur temps de contact et servant de dépôt pour la libération progressive des antibiotiques encapsulés, cet effet peut donc avoir des conséquences importantes sur l'efficacité thérapeutique du traitement administré^{195,237}. Hasan *et al.* ont d'ailleurs démontré cet effet par l'interaction de particules de PLGA encapsulant de la clindamycine et fonctionnalisées en surface par de la polyéthylèneimine, polymère cationique, avec des bactéries *S. aureus* planctoniques²³⁸. Après plusieurs lavages, les particules étaient toujours retenues, délivrant progressivement des concentrations antibiotiques efficaces contrairement à la clindamycine seule entièrement lavée.

Les propriétés de surface des systèmes de délivrance doivent également être considérées vis-à-vis de la clairance de l'organisme dans le cas d'administrations systémiques. Les particules chargées positivement ne peuvent par exemple pas être administrées dans la circulation sanguine afin de ne pas se lier à des protéines telles que les opsonines et entraîner leur élimination rapide, ou être internalisées dans les cellules de l'organisme et causer des

dommages cellulaires mortels^{220,239,240}. Par ailleurs, alors que les nanoparticules hydrophobes comme celles à base de PLGA ou de PLA ont le plus de chance d'être éliminées à cause de plus fortes liaisons avec les composants du sang, elles peuvent être recouvertes de polymères hydrophiles tels que du PEG, les rendant plus furtives et moins détectables^{213,220}. C'est notamment le principe de la technologie développée par Radovic-Moreno *et al.* avec les nanoparticules de PLGA fonctionnalisées par du PEG et de la polyhistidine (PLH)⁵¹. A pH physiologique, ces particules sont chargées négativement et recouvertes de PEG, elles peuvent alors être envisagées pour une administration systémique à travers la circulation sanguine sans interagir avec les cellules humaines. A pH acide, comme celui des biofilms bactériens, la PLH se protone et les particules deviennent positivement chargées, permettant leur interaction avec les bactéries et leur accumulation dans les biofilms (Figure 31).

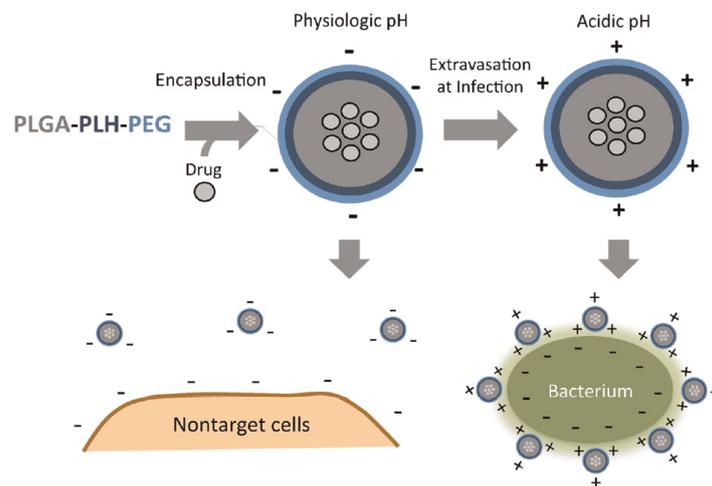


Figure 31. Principe du ciblage charge-dépendant des particules développées par Radovic-Moreno *et al.*⁵¹ sous l'effet du pH

3.4. Développement clinique et industriel limité

3.4.1. Formulations anti-biofilms en essais cliniques et sur le marché

Plusieurs formulations liposomales pour le traitement des biofilms sont en phase de développement clinique. Il n'existe cependant, à ce jour, aucune formulation à base de particules polymériques sur le marché ou en cours d'essais cliniques pour traiter les infections à biofilms²⁰³. Précisément, 4 formulations liposomales sont déjà sur le marché pour le traitement de biofilms fongiques chez des patients immunodéprimés. Il s'agit d'Abelcet[®] développé par la firme Sigma-Tau PharmaSource (Etats-Unis), Amphotec[®] de Ben Venue Laboratories (Etats-Unis), AmBisome[®] d'Astellas (Etats-Unis) et Fungisome[®] de Lifecare

Innovations (Etats-Unis)^{129,195}. Toutes ces formulations consistent en des liposomes encapsulant de l'amphotéricine B, un antifongique capable d'éradiquer des biofilms de *Candida albicans*²⁴¹.

Pour le traitement des biofilms bactériens, il existe depuis très récemment sur le marché la première formulation utilisant un système de délivrance. Arikayce[®], formulation liposomale à base de DPPC et de cholestérol chargée en amikacine est développée par la firme Insméd (Etats-Unis). Son utilisation par nébulisation pour le traitement des infections pulmonaires causées par un groupe de bactéries regroupées sous le terme de complexe *Mycobacterium avium* chez des patients adultes en impasse thérapeutique, a été approuvée par la FDA à la fin d'année 2018²⁴². Ce traitement a notamment démontré sa capacité à retenir l'amikacine dans les voies pulmonaires, à pénétrer dans des biofilms mycobactériens ainsi qu'à réduire la viabilité bactérienne de manière dose-dépendante rapport au traitement non formulé²⁴³. Son utilisation par nébulisation pour le traitement des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose est actuellement en cours de développement. Un essai clinique de phase III a notamment démontré son efficacité par rapport à un traitement standard de tobramycine non formulée²⁴⁴.

D'autres formulations liposomales sont également en cours d'essais cliniques comme Pulmaquin[™] et Lipoquin[™] développés par Aradigm (Etats-Unis). Il s'agit de formulations liposomales nébulisables encapsulant de la ciprofloxacine pour le traitement de patients souffrant de bronchiectasie associée à des infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* (non liée à la mucoviscidose)²⁴⁵. Deux essais cliniques de phase III (ORBIT-3 et ORBIT-4) ont été menés entre 2014 et 2015 pour évaluer l'apport de Pulmaquin[™] par rapport à un placebo. L'efficacité du traitement a été évaluée en mesurant l'apparition d'une première exacerbation pulmonaire chez les patients inclus dans les essais cliniques. Alors que l'un des deux essais a donné une différence significative dans la durée d'apparition de cette exacerbation entre les patients ayant reçu le traitement et les patients ayant reçu le placebo, la différence mesurée pour le second essai n'était pas significative²⁴⁶. Peu d'informations supplémentaires sont disponibles depuis ces essais.

Développée par Axentis Pharma, Fluidosomes[™] présentée en § 3.2.1.5 est une formulation à base de liposomes fusogéniques composés des phospholipides DPPC et DMPG et encapsulant la tobramycine pour le traitement de patients atteints de mucoviscidose présentant des infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa*. Après avoir suivi un essai clinique de phase II dans les années 2000, plus aucune information n'est disponible sur les avancées de ce traitement²⁴⁷. Il en est de même pour MiKasome, une formulation liposomale encapsulant de l'amikacine pour le traitement des infections du tractus urinaire dont le développement a été stoppé après un essai clinique de phase II¹⁹⁵.

3.4.2. Points limitants le développement des systèmes de délivrance

Alors que de nombreuses formulations ont été développées et étudiées à travers le monde, la très grande majorité d'entre elles restent bloquées à l'étape de recherche préclinique.

Les principaux challenges associés à leur translation clinique sont de l'ordre biologique comme leur toxicité à court et long terme et le manque de compréhension de leur mécanismes sous-jacents (mode d'action, devenir dans l'organisme et élimination)^{203,248}. Bien que les matériaux utilisés dans le développement de systèmes de délivrance soient pour la plupart biocompatibles et même pour certains approuvés par la FDA pour d'autres applications (comme le PLGA et le PLA), le design des particules et leur toxicité sur des cellules eucaryotes sont des facteurs qui doivent être évalués avant même des études *in vivo*²⁴⁹. De plus, le manque d'études pertinentes *in vivo* sur des modèles animaux appropriés dressent un frein au développement de ces systèmes¹⁹⁵.

Les points limitants sont également d'ordre réglementaire comme la complexité de la propriété intellectuelle des systèmes développés mais également de la réglementation associée aux nanoparticules²⁰³. Il existe par exemple un manque de *guidelines* spécifiques au développement de nanotechnologies par les autorités réglementaires compétentes comme la FDA²⁵⁰. De plus, la définition et la réglementation spécifique associée aux « nano » technologies, regroupant les particules ayant un diamètre inférieur à 100 nm, freinent considérablement leur développement²⁵¹.

L'aspect industriel dans le développement de formulations particulières est également problématique. Le *scale up* de leur production implique notamment des problèmes de faisabilité à large échelle ainsi que de capacité à être reproductible et économiquement envisageable alors que les traitements antibiotiques sont traditionnellement assez peu chers. Le contrôle qualité est également un obstacle pour la caractérisation de ces traitements produits à échelle industrielle face à des formulations potentiellement complexes^{203,248}. La faible stabilité physique et chimique comme celle des liposomes peut également être un frein dans leur stockage ainsi que dans le choix des moyens de stérilisation à grande échelle.

Ainsi, le procédé de synthèse et le design des systèmes de délivrance doivent être finement considérés pour permettre leur développement clinique et industriel, en réduisant au maximum les points limitants, les coûts et les temps de développement associés.

4. PROJET ET OBJECTIFS

Les systèmes de délivrance de principes actifs sont un outil remarquable pour permettre aux antibiotiques de potentialiser leur effet et contourner les phénomènes de récalcitrance bactérienne. Le design de ces vecteurs doit cependant être finement optimisé pour permettre d'aboutir à un traitement efficace. De plus, les agents anti-biofilms, aussi divers par leur nombre que par leurs mode d'actions, se positionnent comme une stratégie prometteuse en combinaison avec un vecteur d'antibiotique dans la lutte contre les biofilms comme ils sont capables de cibler les mécanismes spécifiques associés au mode de vie en biofilms et de sensibiliser les bactéries à l'action des antibiotiques.

Adjuvatis, startup en biotechnologies dirigée par le Dr Charlotte Primard, développe la technologie i-Particles® issue de 15 années de recherche et développement dans l'équipe du Dr Bernard Verrier (actuellement LBTI – UMR CNRS 5305). Il s'agit de nanoparticules à base de PLA, polymère biodégradable et biocompatible, présentant une forte stabilité dans le temps et synthétisées par un procédé de nanoprécipitation ne nécessitant pas l'utilisation de surfactants et d'agents stabilisants. Des immuno-modulateurs, des anti-oxydants, des fluorophores et d'autres biomolécules ont déjà été encapsulées dans ces particules submicroniques. Dans ce contexte, ce travail de thèse CIFRE a pour objectif de développer une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et d'i-Particles® pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens (Figure 32), en mettant au point une formulation antibiotique à base d'i-Particles® et en évaluant l'efficacité de cette formulation en combinaison avec un agent anti-biofilm sur un modèle bactérien *in vitro* ainsi que sur un modèle *in vivo* de souris. Il permet également d'apporter une expertise sur les biofilms, nouvelle pour Adjuvatis et le LBTI.

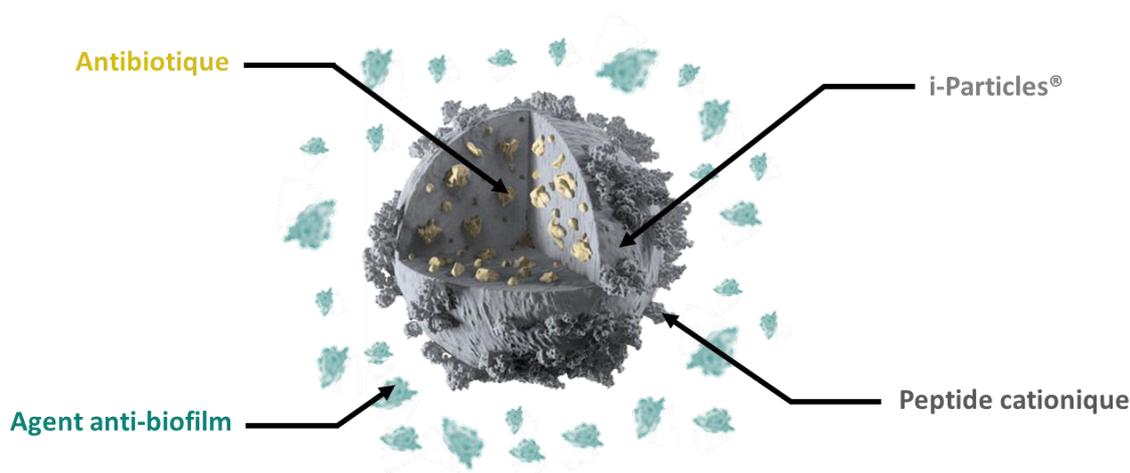


Figure 32. Combinaison thérapeutique développée à base d'i-Particles®

Ce projet s'est donc axé sur trois objectifs principaux :

- Le premier objectif a consisté à développer des formulations d'antibiotiques ou d'agents anti-biofilms avec les i-Particles®. Pour cela, trois antibiotiques ont été identifiés et sélectionnés pour leurs critères physico-chimiques favorisant *a priori* leur encapsulation dans les i-Particles®, ainsi que pour leurs propriétés antibiotiques à large spectre. Le procédé de formulation a été adapté à ces agents pour produire des systèmes particuliers stables et hautement concentrés en antibiotiques. La charge de surface a également fait l'objet d'un travail de formulation pour disposer de particules chargées négativement (nues) et positivement (recouvertes d'un peptide cationique).

- Dans le second objectif, l'impact de la charge de surface des formulations antibiotiques développées a été évalué sur des biofilms bactériens *in vitro*, au travers de leur capacité à interagir avec les bactéries planctoniques, à s'accumuler dans les biofilms et à pouvoir délivrer progressivement des concentrations antibiotiques efficaces. L'apport d'un agent anti-biofilm en combinaison avec cette formulation antibiotique a également été évalué *in vitro* pour sa capacité à inhiber la formation d'un biofilm ainsi qu'à détacher et éradiquer un biofilm établi.

- Le troisième objectif a été d'évaluer l'efficacité de cette thérapie combinatoire sur un modèle *in vivo* de souris présentant un dispositif médical infecté par des biofilms bactériens en sous-cutané. Cette étude n'a pas pu être menée à son terme à cause de la suspension des travaux lors du confinement lié au Covid-19, et constitue ainsi la principale perspective de ce travail.

RESULTATS

1. DEVELOPPEMENT DE FORMULATIONS ANTIBIOTIQUES ET ANTI-BIOFILMS A BASE D'I-PARTICLES®
2. EVALUATION *IN VITRO* DE LA POTENTIALISATION DE LA RIFAMPICINE PAR SON CHARGEMENT DANS DES I-PARTICLES® ET PAR SA COMBINAISON AVEC LA DNASE CONTRE DES BIOFILMS DE *S. AUREUS*
3. MISE EN PLACE DE L'EVALUATION *IN VIVO* DE L'EFFICACITE DE LA COMBINAISON THERAPEUTIQUE SUR UN MODELE MURIN D'INFECTION D'IMPLANT PAR DES BIOFILMS DE *S. AUREUS*

1. DEVELOPPEMENT DE FORMULATIONS ANTIBIOTIQUES ET ANTI-BIOFILMS A BASE D'I-PARTICLES®

1.1. Chargement d'antibiotiques dans les i-Particles®

Les nanoparticules (NP) se positionnent comme un système de délivrance d'antibiotiques prometteur pour surmonter les phénomènes de récalcitrance bactérienne rencontrés sous le mode de vie en biofilm, responsable de l'échec clinique des antibiothérapies^{226,252,253}. Particulièrement, les i-Particles® développées chez Adjuvatis sont composées d'acide poly-lactique (PLA), polymère biodégradable et biocompatible, et ont un diamètre autour de 100-200 nm, optimal pour pénétrer un biofilm et atteindre l'ensemble des bactéries^{213,220,235}. Elles sont également stables d'un point de vue colloïdal, caractéristique fondamentale pour leur capacité de stockage et leur rôle de vecteur dans un organisme²⁰³.

La synthèse des i-Particles® est réalisée par nanoprécipitation en coulant une phase organique contenant le polymère et le principe actif dissouts, dans une phase aqueuse dans lesquels ils sont insolubles (Figure 33). Le chargement d'antibiotiques au cœur des i-Particles® est ainsi limité aux molécules hydrophobes. Les solvants sont ensuite éliminés par évaporation sous pression réduite, permettant d'obtenir une suspension colloïdale de NP dans une solution aqueuse.

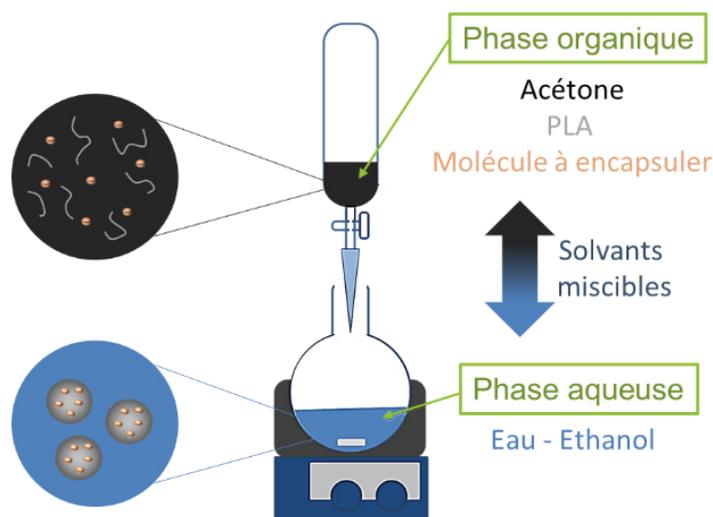


Figure 33. Schéma de nanoprécipitation et de chargement de molécules dans les i-Particles®

Alors que la plupart des antibiotiques disponibles sont des molécules hydrophiles et chargées, trois d'entre eux présentant un intérêt biologique dans la lutte contre les biofilms bactériens, et susceptibles d'être chargés dans les i-Particles®, ont été sélectionnés. Il s'agit de la clarithromycine, de la levofloxacine et de la rifampicine (Tableau 1).

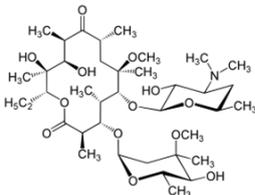
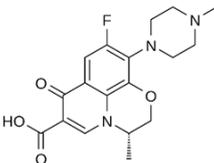
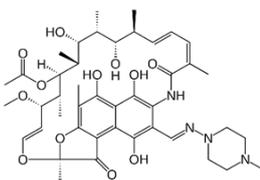
Antibiotique	Clarithromycine	Levofloxacine	Rifampicine
Famille	Macrolide	Fluoroquinolone	Rifamycine
Mode d'action	Bactéricide	Bactéricide	Bactéricide
Spectre antibactérien	Large	Large	Large
Structure			
Poids moléculaire (Da)	748	361	823
Solubilité dans l'eau	Très faible	Modérée	Faible
LogP	3,2	2,1	2,7

Tableau 1. Caractéristiques des antibiotiques sélectionnés pour leur formulation dans des i-Particles®

L'objet de ce chapitre est de décrire les stratégies de synthèse développées pour produire des formulations avec chacun de ces antibiotiques dans les i-Particles®.

1.1.1. Chargement de la clarithromycine

La clarithromycine (CLR) est un antibiotique à large spectre de la famille des macrolides. Elle est couramment utilisée en clinique, comme dans le cas d'infections de l'estomac à *Helicobacter pylori*, mais également pour des infections pulmonaires atypiques à *Chlamydia pneumoniae* ou autres infections pulmonaires et cutanées. La CLR est capable de pénétrer la paroi bactérienne et d'inhiber la synthèse protéique en se liant à l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S des bactéries, bloquant la translocation des acides aminés lors de la traduction. Généralement bactériostatique, son activité bactéricide a été démontrée sur de nombreuses souches bactériennes comme *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Streptococcus pyogenes*²⁵⁴⁻²⁵⁶.

Son faible poids moléculaire et sa très faible solubilité dans l'eau en font un candidat intéressant pour être chargé dans des i-Particles®. Différentes formulations ont été préparées, puis elles ont été caractérisées pour leurs propriétés physico-chimiques et le taux de chargement en principe actif a été quantifié.

En absence de principe actif, la technique de nanoprecipitation développée chez Adjuvatis résulte en une suspension blanche et homogène (Tableau 2). Les NP ont un diamètre hydrodynamique moyen d'environ 170 nm et un indice de polydispersité faible (IP < 0,1) caractéristique d'une population homogène en taille. Une charge de surface très négative, caractérisée par un potentiel zêta de près de -50 mV, est conférée par les fonctions carboxyliques en bout de chaîne du PLA composant les NP. Ces fonctions ayant une certaine affinité pour l'environnement aqueux sont probablement exposées en surface des NP et sont chargées négativement au pH de la solution (pKa de 3,9). En l'absence de tensio-actif pour stabiliser les NP, ces répulsions électrostatiques fortes assurent une stabilité colloïdale pendant plusieurs mois.

Composition phase aqueuse	Taux de chargement théorique (%)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	pH	Stabilité (4°C)
Eau	0	Homogène	168 ± 2	0,05 ± 0,01	- 48 ± 2	5,5	Plusieurs mois
Bicarbonate 5 mM	0	Homogène	118 ± 1	0,07 ± 0,01	- 55 ± 1	8,5	Plusieurs mois
Eau	1	Agrégats	-	-	-	5,5	-
Bicarbonate 5 mM	1	Homogène	116 ± 1	0,10 ± 0,01	- 34 ± 4	8,5	Plusieurs mois

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques de NP et de NP chargées en CLR en fonction de la phase aqueuse utilisée lors de la nanoprecipitation (eau purifiée ou solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 5 mM) et du taux de chargement en CLR

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot représentatif d'au moins deux lots indépendants.

La formulation de la CLR à 1% de taux de chargement théorique (correspondant à la masse de CLR par rapport à la masse de PLA) dans les NP, réalisée dans les conditions standards de synthèse décrites précédemment, conduit à la formation d'agrégats immédiatement après évaporation des solvants (Figure 34). Il s'agit probablement d'un phénomène d'agrégation entre la CLR, présentant une charge positive au pH 5,5 par son groupement amine tertiaire (pKa de 8,8)²⁵⁷, et les charges négatives des NP. Pour limiter ces interactions électrostatiques, la production de NP a été réalisée à pH à 8,5, en remplaçant l'eau contenue dans la phase aqueuse par une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à 5 mM. La suspension finale est alors homogène (Figure 34), et les NP chargées en

CLR (NP-CLR) ont des caractéristiques physico-chimiques similaires aux NP sans principe actif et synthétisées à pH 8,5, se traduisant notamment par un diamètre plus petit, d'environ 120 nm (Tableau 2).



Figure 34. Photographies de la suspension de NP-CLR avec un taux de chargement de 1% montrant l'aspect obtenu après évaporation des solvants lorsque la phase aqueuse est composée d'eau (à gauche) ou de bicarbonate 5 mM (à droite)

La suspension de NP-CLR à 1% de taux de chargement suit une distribution normale de la taille des NP (Figure 35). De plus, l'analyse morphologique des NP-CLR par microscopie électronique à balayage a confirmé que les NP de forme sphérique suivent une distribution étroite en taille traduisant l'homogénéité en taille des NP. Elles sont également stables plusieurs mois lorsqu'elles sont stockées à 4°C.

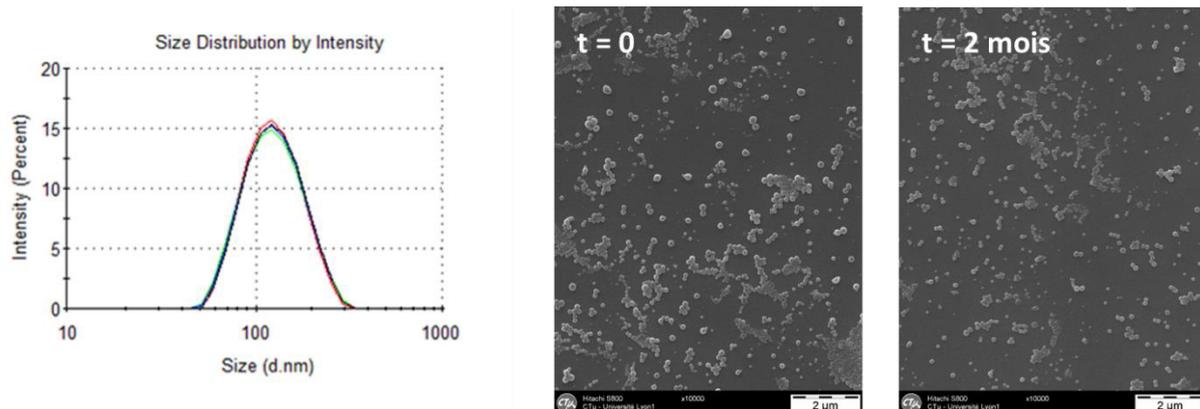


Figure 35. Distribution normale de la taille (en intensité) de NP-CLR possédant un taux de chargement théorique de 1% Acquisitions obtenues au Malvern par diffusion dynamique de la lumière. Les courbes représentent quatre mesures indépendantes d'un même lot. Micrographies de NP-CLR à 1% à t=0 et après 2 mois de stockage à 4°C, obtenues par microscopie électronique à balayage.

Des NP-CLR ont alors été synthétisées dans des solutions de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 5 mM avec des taux de chargement théoriques croissants et ont été caractérisées comme précédemment pour leurs propriétés colloïdales (Tableau 3). Leur stabilité dans le temps à 4°C a également été suivie en réalisant des analyses similaires. Lorsque le taux de chargement en CLR augmente, le diamètre hydrodynamique des particules tend à diminuer légèrement et l'indice de polydispersité reste faible. Cependant, les NP-CLR de 2 à 5% sont peu stables et agrègent fortement avant 72h de stockage à 4°C. A partir de 6% de taux de chargement, de gros agrégats ont été observés immédiatement après évaporation des solvants. Le taux et l'efficacité de chargement ont été mesurés par HPLC-UV en quantifiant la CLR dans la fraction totale, et dans les fractions libre et encapsulé après séparation par centrifugation des NP. Seule la suspension de NP-CLR chargée à 1% a pu être précisément quantifiée, la présence d'agrégats de CLR dans les autres suspensions ayant gêné ce processus. Son efficacité de chargement (quantité de CLR chargée dans les NP par rapport à la quantité totale de CLR) est de 61% et son taux de chargement réel (quantité de CLR chargée dans les NP par rapport à la quantité de NP de PLA) de 0,6%.

Taux de chargement théorique (%)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement (%)
1	Homogène	116 ± 1	0,10 ± 0,01	- 34 ± 4	Plusieurs mois	61 ± 4
2	Légers agrégats	102 ± 3	0,11 ± 0,03	- 37 ± 4	< 72h	-
5	Légers agrégats	94 ± 1	0,11 ± 0,02	- 51 ± 1	< 72h	-
6	Gros agrégats	-	-	-	-	-
10	Gros agrégats	-	-	-	-	-

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques de NP-CLR à des taux de chargement croissants (bicarbonate à 5 mM) Quantification de CLR par dosage en HPLC-UV des fractions totales, chargées et libres. Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Cette étude a permis de développer une technique de nanopréciipitation adaptée au chargement de la clarithromycine dans des NP de PLA, en neutralisant sa charge cationique par augmentation du pH de la phase aqueuse. Cependant, nous n'avons pas réussi à produire des lots de NP associées à de fortes doses de CLR, sans qu'elles soient déstabilisées en moins de trois jours. Ces formulations ne sont, en l'état, pas exploitables pour des évaluations d'efficacité ou comme traitement antibiotique.

1.1.2. Formulation de la levofloxacin

La levofloxacin (LVX) est un antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones. Elle est notamment utilisée dans le cas de pneumopathies, d'infections urinaires, dans certaines infections gastriques ainsi que pour traiter la tuberculose. Elle bloque la réplication bactérienne en inhibant l'ADN gyrase ainsi que la topoisomérase IV impliquées dans le surenroulement et la séparation de l'ADN. L'inhibition de ce processus vital conduit à la mort bactérienne, faisant de cette molécule un antibiotique bactéricide. Son activité est efficace à large spectre, autant sur des bactéries Gram négatif comme *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *H. influenzae* ou *P. aeruginosa*, que sur des bactéries Gram positif comme *E. faecalis*, *S. aureus* ou *S. pneumoniae*. Malgré une solubilité modérée dans l'eau, son logP de 2,1 ainsi que sa petite taille (361 Da) en font un antibiotique adapté au procédé de nanoprécipitation. Différentes formulations ont été développées et caractérisées pour leurs propriétés colloïdales et leur taux de chargement.

En suivant le protocole standard de synthèse, les NP-LVX ont immédiatement agrégé après évaporation des solvants (Tableau 4). De même qu'avec la CLR, il s'agirait d'une agrégation des NP due au pH relativement acide de la phase aqueuse (pH 5,5). Des interactions électrostatiques pourraient exister entre les charges négatives des NP et les charges cationiques de la LVX dont le pKa de l'amine du cycle piperazine est de 7,9²⁵⁸. Une stratégie similaire à la CLR a été suivie pour la synthèse des NP-LVX, en remplaçant l'eau de la phase aqueuse par une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à plusieurs concentrations molaires (de 0,5 mM à 50 mM).

[Bicarbonate] (mM)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	pH	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement (%)	Taux de chargement réel (%)
0	Agrégats	-	-	5,5	-	-	-
0,5	Homogène	150 ± 1	0,07 ± 0,01	7,5	Quelques heures	33 ± 2	0,60 ± 0,1
5	Homogène	114 ± 1	0,06 ± 0,02	8,5	Plusieurs mois	25 ± 2	0,50 ± 0,1
50	Homogène	103 ± 2	0,06 ± 0,01	9,5	Plusieurs mois	2 ± 1	0,04 ± 0,01

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques de NP-LVX avec des concentrations croissantes de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium dans la phase aqueuse de nanoprécipitation (taux de chargement théorique de LVX à 2%) Quantification de LVX par dosage en spectrophotométrie-UV des fractions totales, chargées et libres. Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Lors de la synthèse des NP-LVX, lorsqu'on augmente la concentration du tampon bicarbonate composant la phase aqueuse, le pH des suspensions augmente ainsi que leur stabilité. En revanche, le diamètre des NP produites diminue ainsi que l'efficacité de

chargement de la LVX. Pour la plus faible concentration en sel, le pH de la suspension (7,5) est très proche du pKa de l'amine (7,9) et la formation d'interactions électrostatiques attractives entre la LVX et le PLA conduit à l'agrégation des NP en quelques heures seulement (Tableau 4). Dans ces conditions de synthèse, l'efficacité de chargement est modérée (seulement 33%), pour un taux de chargement théorique de 2%. A pH 8,5 et à pH 9,5, la LVX ne présente plus de charge positive et les formulations de NP-LVX obtenues sont homogènes et stables plusieurs mois. Les efficacités de chargement sont cependant très faibles, respectivement à 25% et 2%, pour un taux de chargement théorique de 2%.

La LVX a été formulée dans des NP avec des taux de chargement théoriques croissants, en utilisant du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à 5 mM dans la phase aqueuse (pH 8,5), dans le but de disposer de formulations suffisamment concentrées en LVX pour les tests anti-biofilms. Elles ont ensuite été caractérisées comme précédemment pour leurs propriétés colloïdales et leur stabilité à 4°C a été suivie (Tableau 5).

Taux de chargement théorique (%)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement (%)
1	Homogène	117 ± 1	0,08 ± 0,02	- 56 ± 3	Plusieurs mois	27 ± 1
3	Homogène	108 ± 1	0,11 ± 0,01	- 66 ± 4	Plusieurs mois	22 ± 1
5	Homogène	106 ± 1	0,12 ± 0,01	- 53 ± 3	Plusieurs mois	31 ± 1
7,5	Homogène	101 ± 1	0,10 ± 0,01	- 60 ± 3	Plusieurs mois	19 ± 1
15	Homogène	91 ± 1	0,10 ± 0,01	- 60 ± 2	Plusieurs mois	34 ± 1

Tableau 5. Caractéristiques physico-chimiques de NP-LVX à des taux de chargement théoriques croissants (bicarbonate à 5 mM)

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Avec des valeurs d'IP relativement faibles plus ou moins égales à 0,1, l'ensemble des formulations développées sont stables plusieurs mois à 4°C sur la gamme de taux de chargement théorique en LVX testée allant de 1 à 15%. L'augmentation de ce taux a tendance à diminuer le diamètre des NP mais l'efficacité de chargement de la LVX dans les NP ne varie pas de manière dose dépendante et se situe autour d'une valeur moyenne proche de 30% (Figure 36). Les taux de chargement réels, proportionnellement à la quantité de LVX totale ajoutée lors des synthèses, augmentent de 0,3 à 5,1% pour des concentrations totales de LVX allant de 300 à 3000 µg/mL respectivement.

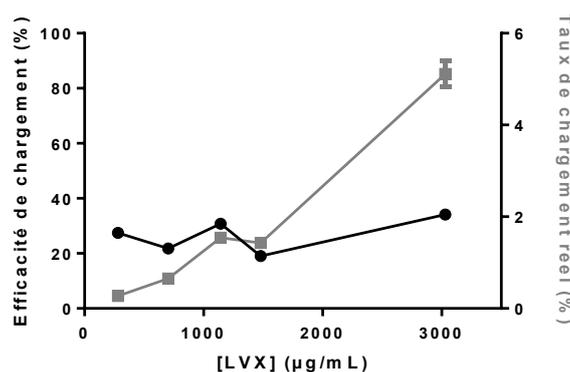


Figure 36. Quantification de la LVX dans des NP à des taux de chargement théoriques croissants (bicarbonate à 5 mM)
Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Cette étude a permis d'obtenir des formulations de levofloxacin à fort taux de chargement dans des NP de PLA, en neutralisant sa charge cationique par augmentation du pH de la phase aqueuse à une valeur supérieure au pKa de sa base. Cependant, la LVX étant relativement soluble dans la phase aqueuse de nanopréciptation, l'efficacité de chargement reste faible, avec des formulations caractérisées par environ 30% de LVX associée aux NP, tandis que 70% environ est solubilisée dans la phase aqueuse. Cette efficacité de chargement trop faible compromet l'utilisation de ces formulations contre des biofilms.

1.1.3. Chargement de la rifampicine

La rifampicine (RIF) appartient à la famille des rifamycines. Il s'agit d'un antibiotique utilisé pour traiter de nombreuses infections bactériennes, notamment la tuberculose causée par *Mycobacterium tuberculosis*, la lèpre (*Mycobacterium leprae*) et la légionellose (*Legionella pneumophila*). Elle est également prescrite dans le cas d'infections à *H. influenzae*. Responsable de l'apparition rapide de résistances bactériennes, cet antibiotique est prescrit en combinaison avec d'autres antibiotiques comme l'isoniazide pour traiter la tuberculose ou la clarithromycine pour traiter l'ulcère de Buruli causée par *Mycobacterium ulcerans*. La RIF est également active contre *S. aureus* contre laquelle est prescrite en combinaison avec l'acide fusidique. Son activité à large spectre cible autant des bactéries Gram négatif que Gram positif mais elle est inefficace sur certains genres bactériens comme *Pseudomonas*. Elle exerce une activité bactéricide en formant un complexe avec l'ARN polymérase bactérienne, inhibant la transcription des ARNm. La RIF présente également une hydrophobicité adéquate avec le procédé de nanopréciptation. Elle a été formulée dans des NP qui ont été caractérisées pour leurs propriétés colloïdales et leur taux de chargement.

Comme les NP-CLR et NP-LVX, les NP-RIF ont agrégé directement après synthèse dans les conditions standards (Tableau 6). La RIF possède également une amine dans son cycle piperazine (pKa à 7,9)²⁵⁹, donnant une charge positive à la molécule au pH de synthèse des NP (5,5) et interagissant avec la surface négative des NP. L'eau de la phase aqueuse a été remplacée par une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à plusieurs concentrations molaires (de 0,5 mM à 25 mM). Pour les plus faibles concentrations en bicarbonate, similairement aux NP-LVX, le pH des suspensions (7,5) est très proche du pKa de l'amine de RIF (7,9) mais ne permet pas de réduire suffisamment les interactions électrostatiques avec les NP pour que les suspensions soient stables longtemps. A des pH supérieurs au pKa de l'amine, la RIF ne présente plus de charge positive et les formulations sont stables plusieurs mois à 4°C. Dans le même temps, l'efficacité de chargement de RIF diminue, passant d'un chargement maximal proche de 100% à 34%.

[Bicarbonate] (mM)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	pH	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement (%)
0	Agrégats	-	-	-	-	-	-
0,5	Homogène	NA	NA	NA	7,5	< 2h	94 ± 1
1,5	Homogène	150 ± 1	0,07 ± 0,01	- 56 ± 2	7,5	< 24h	94 ± 1
2	Homogène	140 ± 1	0,07 ± 0,01	- 59 ± 4	8,0	Plusieurs mois	94 ± 1
3	Homogène	141 ± 2	0,06 ± 0,01	- 57 ± 2	8,5	Plusieurs mois	71 ± 1
5	Homogène	143 ± 1	0,07 ± 0,01	- 55 ± 1	8,5	Plusieurs mois	33 ± 1
25	Homogène	137 ± 1	0,09 ± 0,02	- 60 ± 1	9,5	Plusieurs mois	34 ± 1

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF avec des concentrations croissantes de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium dans la phase aqueuse de nanoprécipitation (taux de chargement théorique de RIF à 1%) Dosage de RIF par spectrophotométrie des fractions totales, chargées et libres. Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

En appliquant les conditions de synthèse optimisées (bicarbonate à 2 mM, pH 8), des NP ont été produites avec des concentrations croissantes de RIF (1 à 10% de taux de chargement théorique). Dans tous les cas, les suspensions produites sont homogènes, les valeurs d'IP étant inférieures à 0,1, et stables, les valeurs de potentiel zêta étant largement inférieures à -30 mV (Tableau 7). Le diamètre des NP tend modestement à augmenter en fonction du taux de chargement. En terme de stabilité colloïdale, seules les formulations aux taux de chargement les plus réduits ont démontré une stabilité sur le long terme à 4°C. Les autres suspensions ont agrégé en quelques jours. On peut émettre l'hypothèse que pour ces

solutions concentrées en RIF, la RIF non encapsulée atteint sa limite de solubilité et forme des amas insolubles, conduisant à la déstabilisation du système.

Taux de chargement théorique (%)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement (%)
1	Homogène	140 ± 1	0,07 ± 0,01	- 59 ± 4	Plusieurs mois	94 ± 1
2	Homogène	144 ± 2	0,08 ± 0,02	- 56 ± 4	Plusieurs mois	91 ± 1
5	Homogène	155 ± 1	0,07 ± 0,01	- 55 ± 4	Quelques jours	68 ± 1
10	Homogène	164 ± 2	0,08 ± 0,01	- 57 ± 2	Quelques jours	63 ± 1

Tableau 7. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF à des taux de chargement croissants (bicarbonate à 2 mM)
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Pour le taux de chargement le plus faible (1%), l'efficacité de chargement est élevée (94%, Figure 37). Elle diminue lorsque des concentrations plus importantes de RIF sont introduites durant la synthèse, jusqu'à 63% d'efficacité de chargement pour un taux de chargement réel d'environ 6%.

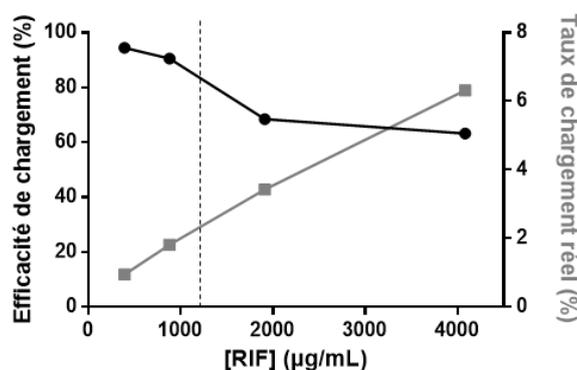


Figure 37. Efficacité et taux de chargement réel de la RIF dans les NP en fonction de la concentration de RIF totale (bicarbonate à 2 mM)

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné. Le trait en pointillé indique la limite de stabilité observée pour les suspensions à 4°C.

Une formulation de NP-RIF à 2% de taux de chargement a été suivie pour sa stabilité sur 60 jours à 4°C. Elle est stable sur l'ensemble de la période testée, avec un taux de chargement et un diamètre hydrodynamique constants (Figure 38). La morphologie de ces NP-RIF a été observée après 60 jours de stockage à 4°C au microscope électronique à balayage, révélant des NP sphériques et non agrégés, conformes à des NP stables en suspension.

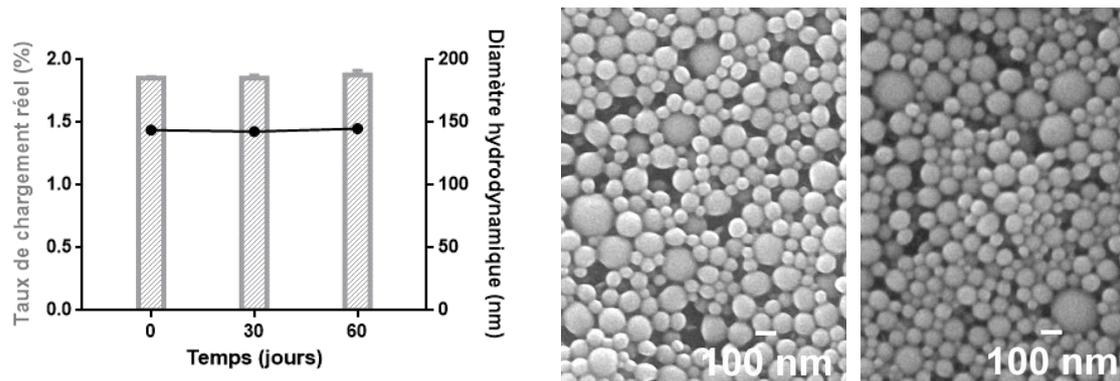


Figure 38. Taux de chargement de la RIF dans les NP et diamètre hydrodynamique en fonction du temps de stockage à 4°C (bicarbonate à 2 mM et taux de chargement théorique à 2%). Observation morphologique de NP fraîchement synthétisées (à gauche) et des NP-RIF (à droite) après 2 mois de stockage à 4°C par microscopie électronique à balayage
Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

La formulation optimale retenue pour les tests biologiques réalisés dans ce travail de thèse présente un taux de chargement théorique de 2% de RIF dans des NP de PLA. Il s'agit d'une formulation stable plusieurs mois à 4°C, avec une efficacité de chargement élevée, supérieure à 90%, et une concentration totale de RIF également suffisamment élevée, proche de 1 mg/mL.

1.2. Adsorption de biomolécules à la surface des i-Particles®

1.2.1. Inversion de la charge de surface des particules

Le mode d'action des nanoparticules dans les biofilms est essentiel à évaluer pour améliorer le design de ces vecteurs et optimiser leur fonctionnalité dans la délivrance d'antibiotiques. Les propriétés physico-chimiques des NP jouent un rôle crucial dans leur comportement avec les biofilms bactériens, et notamment pour leur transport, leurs interactions, leur pénétration et leur rétention dans ces biofilms^{230,260}. Particulièrement, la charge positive de surface des vecteurs est responsable d'un ciblage passif et non spécifique des biofilms¹⁹⁵. Grâce à des interactions électrostatiques avec les bactéries présentant une charge globale négative et les composants de la matrice pour certains chargés négativement comme l'ADNe ou des polysaccharides, les NP peuvent être retenues dans le biofilm et délivrer l'antibiotique au plus proche de leur cible¹⁹⁵.

Les i-Particles® développées chez Adjuvatis sont hydrophobes et négativement chargées à pH physiologique, du fait de la présence d'un acide carboxylique (pKa de 3,9) au

bout des chaînes de PLA, à la surface des NP. Cette surface peut être fonctionnalisée par adsorption d'une molécule grâce à des interactions hydrophobes ou électrostatiques avec le polymère. Pour cela, la molécule et les NP sont mélangées volume à volume et soumises à agitation pour favoriser cette adsorption.

L' α -poly-L-lysine (PLL) est un polymère homo-peptidique cationique (pKa de 10,2) composé de résidus lysines branchés au niveau du groupement amine α présent sur leur chaîne principale. La lysine est un acide aminé présentant une chaîne latérale hydrophobe à 4 carbones et un groupement amine primaire terminal protonable (Figure 39). Son poids moléculaire peut varier de quelques kDa à plusieurs dizaines de kDa dépendamment du nombre de résidus lysines présents dans sa structure. La PLL est généralement utilisée en biologie comme facteur d'attachement pour permettre le coating de tissus ou l'adhérence de cellules à une surface par des interactions électrostatiques attractives. Elle est également un outil modèle en ingénierie thérapeutique, couramment utilisée au sein de notre laboratoire pour servir d'intermédiaire cationique entre des NP et d'autres composants chargés négativement^{261,262}.

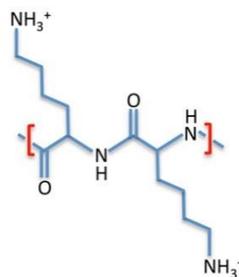


Figure 39. Structure chimique de la PLL

L'adsorption de la PLL à la surface de différentes formulations de NP-RIF a été développée et optimisée en variant le tampon d'adsorption, le taux de solide des NP puis la concentration de PLL, afin d'obtenir des suspensions stables de NP-RIF-PLL dont la charge de surface est inversée vers des valeurs positives. Elles ont été caractérisées pour leurs propriétés colloïdales et l'efficacité de chargement de la RIF.

Pour cela, des NP-RIF (2% de taux de chargement, en tampon bicarbonate 2 mM) ont été mélangées volume à volume avec de la PLL en solution dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à 2 mM (pH 8) ou de l'eau (pH 5,5), pendant 1h sous agitation sur roue. Les suspensions obtenues sont homogènes et stables quelques heures avec un IP supérieur à 0,1 (Tableau 8). Le diamètre hydrodynamique des NP avec PLL adsorbée est supérieur à celui des particules nues, augmentant de 20 nm environ. Le potentiel zêta des NP est inversé, devenant hautement positif lorsque la PLL est adsorbée. Alors que la formulation

de NP-RIF-PLL dans un tampon d'adsorption composé de bicarbonate ne modifie pas l'efficacité de chargement de la RIF, celle dans de l'eau provoque la diffusion de près de la moitié de la RIF hors des NP. Le tampon bicarbonate permet donc de recouvrir les NP-RIF de façon efficace par la PLL, provoquant une inversion de charge des NP. L'antibiotique ne s'est pas libéré hors des NP durant le processus, mais des problèmes de stabilité colloïdale demeurent.

Tampon d'adsorption	Taux de solide (%)	[PLL] (µg/mL)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement de RIF (%)
-	-	-	Homogène	144 ± 2	0,08 ± 0,02	- 56 ± 4	Plusieurs mois	91 ± 1
Bicarbonate	0,5	500	Homogène	167 ± 1	0,16 ± 0,01	+ 52 ± 1	Quelques heures	91 ± 1
Eau	0,5	500	Homogène	155 ± 1	0,10 ± 0,02	+ 51 ± 2	Quelques heures	55 ± 2

Tableau 8. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL synthétisées dans de l'eau ou du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Des formulations de NP-RIF-PLL ont alors été réalisées en faisant varier la proportion de NP pour une concentration de PLL fixe dans du bicarbonate à 2 mM. Avec le plus fort taux de solide testé, les NP agrègent quelques minutes après l'ajout de la PLL aux NP (Tableau 9). En revanche, quand la quantité de NP est réduite, l'indice de polydispersité des NP-RIF-PLL ainsi formées diminue pour atteindre des valeurs inférieures à 0,1 et la stabilité colloïdale des NP est maintenue sur plusieurs jours. L'inversion de charge de -56 à +56 mV atteste d'un bon recouvrement des NP par la PLL, n'impactant pas le chargement de la RIF.

Taux de solide (%)	[PLL] (µg/mL)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité de chargement de RIF (%)
-	-	Homogène	144 ± 2	0,08 ± 0,02	- 56 ± 4	Plusieurs mois	91 ± 1
0,25	750	Homogène	155 ± 1	0,05 ± 0,01	+ 56 ± 2	Plusieurs jours	88 ± 1
0,5	750	Homogène	177 ± 5	0,19 ± 0,03	+ 54 ± 2	Quelques heures	90 ± 1
1,0	750	Agrégats	-	-	-	-	-

Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL avec des taux de solide croissants de NP pour une concentration fixe de PLL de 750 µg/mL dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Dans le but d'identifier la concentration de PLL nécessaire et suffisante pour former des particules cationiques stables, des NP-RIF-PLL ont été préparées à un taux de solide fixe

de 0,25% et avec de la PLL en concentrations croissantes dans du bicarbonate à 2 mM. En diminuant la concentration de PLL, le diamètre des NP a tendance à augmenter et les suspensions deviennent moins stables avec un IP supérieur à 0,1 (Tableau 10) lorsque la concentration de PLL est inférieure à 500 µg/mL. Le potentiel zêta des formulations est supérieur à +30 mV pour l'ensemble des formulations testées. La stabilité des NP-RIF-PLL est donc plus importante lorsque la PLL est ajoutée en grande quantité.

[PLL] (µg/mL)	Taux de solide (%)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)
150	0,25	Homogène	209 ± 1	0,18 ± 0,01	+ 47 ± 1	Quelques heures
250	0,25	Homogène	181 ± 1	0,18 ± 0,01	+ 51 ± 2	Quelques heures
500	0,25	Homogène	162 ± 2	0,06 ± 0,02	+ 40 ± 2	Plusieurs jours
750	0,25	Homogène	155 ± 1	0,05 ± 0,01	+ 56 ± 2	Plusieurs jours

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques de NP-RIF-PLL avec des concentrations croissantes de PLL pour un taux de solide fixe de NP de 0,25% dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%).

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

La morphologie des NP-RIF-PLL obtenues dans des conditions favorables à la stabilité colloïdale (0,25% de taux de solide et 500 µg/mL de PLL) a été observée au microscope électronique à balayage. On peut observer des NP sphériques, conformes à des NP stables en suspension (Figure 40).

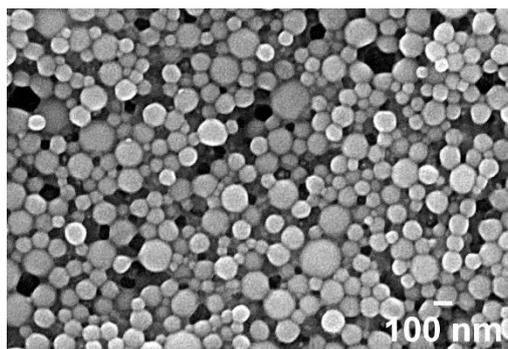


Figure 40. Observation morphologique de NP-RIF-PLL (bicarbonate à 2 mM, taux de chargement théorique à 2%, taux de solide à 0,25% et PLL à 500 µg/mL) par microscopie électronique à balayage

Une formulation de NP-RIF-PLL stable plusieurs jours à 4°C a été obtenue avec le taux de solide le plus élevé possible (0,25%) et une concentration de PLL minimale (500 µg/mL). La charge de surface des NP est efficacement inversée (+40 mV) et l'efficacité de chargement de la RIF est maintenue par rapport à la formulation de NP-RIF.

1.2.2. Fonctionnalisation par un agent anti-biofilm

La co-délivrance d'agents thérapeutiques est une stratégie intéressante pour éradiquer les biofilms, en permettant d'intervenir à différents niveaux et en multipliant les modes d'action. En combinant un antibiotique encapsulé dans des particules avec un agent anti-biofilm adsorbé à leur surface, son activité peut être potentialisée et amener à l'éradication complète du biofilm^{195,226}.

La DNase I (31 kDa) est une enzyme capable de dégrader l'ADN, notamment présent dans la matrice des biofilms bactériens⁶⁹. L'effet de son adsorption sur des NP chargées par des antibiotiques contre des biofilms a fait l'objet d'études prometteuses dans lesquelles elle a démontré sa capacité à augmenter l'activité bactéricide d'antibiotiques²²⁶⁻²²⁹.

Des formulations de NP-RIF adsorbant de la DNase en surface ont été développées et optimisées en variant le taux de solide des NP puis la concentration de DNase afin d'obtenir des suspensions stables de NP-RIF-DNase. Elles ont été caractérisées pour l'efficacité d'adsorption de la DNase, l'efficacité de chargement de la RIF et leurs propriétés colloïdales. D'abord, des formulations avec des proportions de NP-RIF (2% de taux de chargement) croissantes ont été caractérisées après mélange volume à volume avec une concentration de DNase fixe (50 µg/mL) dans du bicarbonate à 2 mM (Figure 41). Sur l'ensemble des taux de solide testés, les formulations sont stables et leur efficacité d'adsorption (quantité de DNase adsorbée sur les NP par rapport à la quantité totale de DNase) augmente pour atteindre 80% au plus fort taux de solide. En revanche, le taux d'adsorption (quantité de DNase adsorbée sur les NP par rapport à la quantité de NP de PLA) chute vers des valeurs quasi nulles. Le taux de solide retenu pour la formulation de DNase sur des NP-RIF est donc de 0,25%, entraînant la meilleure efficacité d'adsorption pour un taux d'adsorption relativement élevé.

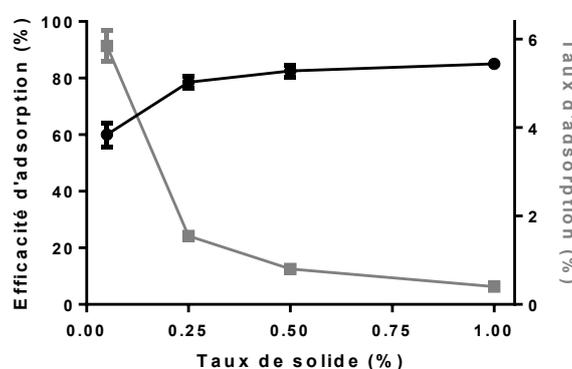


Figure 41. Efficacité et taux d'adsorption de la DNase sur les NP-RIF en fonction du taux de solide (bicarbonate à 2 mM) La concentration de DNase est fixe (50 µg/mL). Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Pour déterminer la proportion de DNase maximale que l'on peut adsorber, des NP-RIF ont été mélangées à un taux de solide fixe de 0,25% avec des concentrations croissantes de DNase dans du bicarbonate à 2 mM (Figure 42). L'augmentation de la quantité de DNase introduite est corrélée à une légère diminution de l'efficacité d'adsorption sur les NP-RIF (proche de 80% au minimum), tandis que le taux d'adsorption augmente proportionnellement, atteignant 4% pour 150 µg/mL.

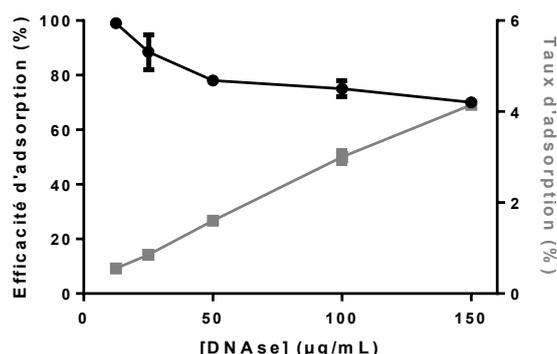


Figure 42. Efficacité et taux d'adsorption de la DNase sur les NP-RIF selon la concentration de DNase (bicarbonate à 2 mM). Le taux de solide des NP-RIF est fixe (0,25%). Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

Les propriétés colloïdales d'une des formulations optimisées de NP-RIF-DNase sont présentées ci-dessous (Tableau 11). Stable plusieurs mois à 4°C, ni le potentiel zêta ni l'efficacité de chargement de la RIF ne sont impactés par l'adsorption de la DNase. La morphologie des NP-RIF-DNase observée au microscope électronique à balayage confirme la conformité des NP sphériques et leur stabilité en solution (Figure 43).

Taux de solide (%)	[DNase] (µg/mL)	Aspect	Diamètre (nm)	IP	Potentiel zêta (mV)	Stabilité (4°C)	Efficacité d'adsorption de DNase (%)	Efficacité de chargement de RIF (%)
-	-	Homogène	144 \pm 2	0,08 \pm 0,02	- 56 \pm 4	Plusieurs mois	-	91 \pm 1
0,25	100	Homogène	178 \pm 2	0,06 \pm 0,01	-52 \pm 2	Plusieurs mois	75 \pm 1	85 \pm 2

Tableau 11. Caractéristiques physico-chimiques de la formulation optimisée de NP-RIF-DNase dans du bicarbonate de sodium/carbonate de sodium 2 mM (taux de chargement théorique de RIF à 2%)

Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de quatre mesures pour un lot donné.

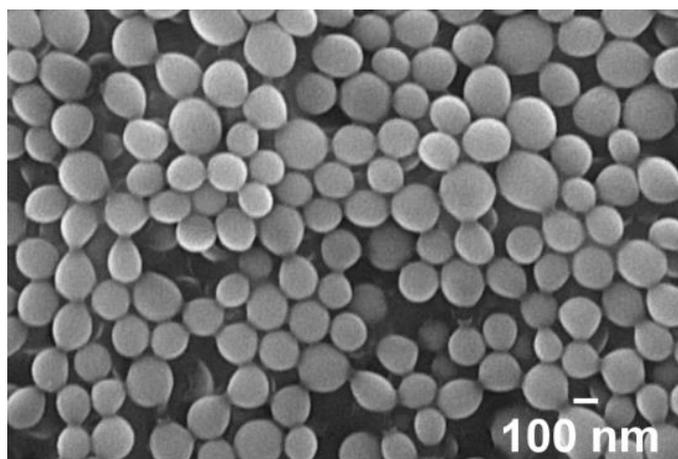


Figure 43. Observation morphologique de NP-RIF-DNase (bicarbonate à 2 mM, taux de chargement théorique à 2%, taux de solide à 0,25% et DNase à 100 µg/mL) par microscopie électronique à balayage

Cette formulation combinatoire n'a cependant pas été évaluée pour les essais sur biofilms dans la suite du projet mais c'est un travail qui peut avoir du potentiel dans des études ultérieures.

1.3. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons développé des formulations antibiotiques à base d'i-Particles® à l'aide de trois molécules que sont la clarithromycine, la levofloxacine et la rifampicine. Elles présentent des propriétés biologiques d'intérêt pour ce projet de thèse ainsi que des caractéristiques physico-chimiques en adéquation avec la technique de nanopréciptation développée chez Adjuvatis.

Ce procédé de production de particules a été adapté pour pallier les phénomènes d'agrégation observés dans les conditions standards de synthèse. Les antibiotiques, présentant des amines cationiques dans leur structure au pH de synthèse des NP (5,5), ont probablement induit la précipitation des NP par agrégation suite à des interactions électrostatiques entre la surface chargée négativement des NP et l'amine chargée positivement des antibiotiques (Figure 44). La répulsion électrostatique des charges négatives des NP serait alors masquée et ne permettrait plus de maintenir la stabilité colloïdale entre NP. L'utilisation d'une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium pour augmenter le pH de synthèse des NP vers des valeurs permettant de neutraliser les charges positives des antibiotiques ($\text{pH} > \text{pKa}$ de l'amine) a résulté dans des suspensions stables. De plus, des interactions hydrophobes avec le polymère pourraient être favorisées, permettant d'augmenter le chargement des antibiotiques dans le cœur hydrophobe des NP²⁶³.

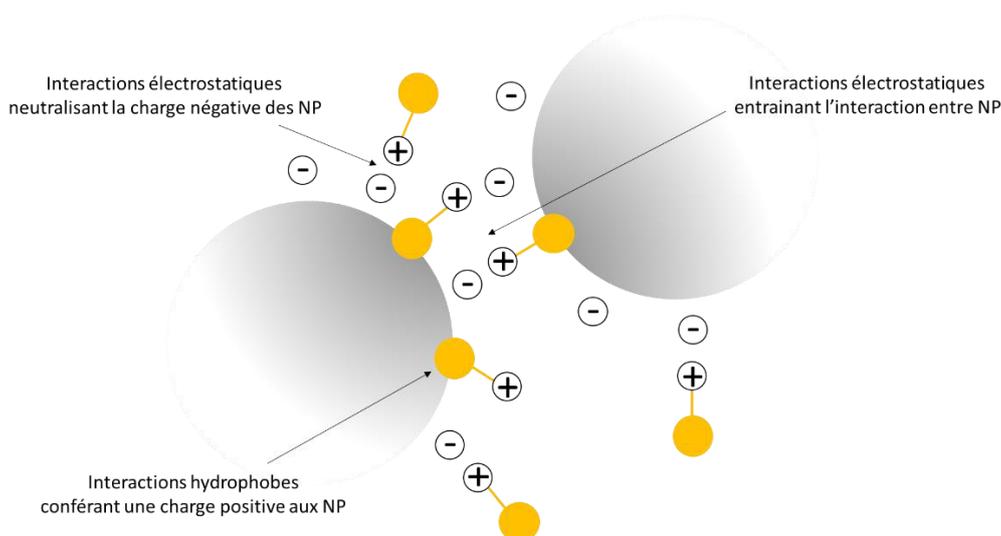


Figure 44. Schéma des possibles interactions entre NP (en gris) et antibiotique (en jaune) menant à l'agrégation des NP

Barichello *et al.* ont évalué la capacité d'encapsulation de molécules dans des NP de PLGA synthétisées par nanoprécipitation en fonction de leur solubilité. Plus les molécules sont hydrophobes et plus elles sont encapsulées en grandes quantités²⁶³. En revanche, les molécules les plus hydrophiles interagissent faiblement avec le PLGA, promouvant leur diffusion dans le surnageant aqueux des suspensions de NP²⁶³. De plus, la solubilité aqueuse des antibiotiques est dépendante du pH de la solution et propre à chaque molécule. En modifiant la concentration de bicarbonate dans la phase aqueuse de nanoprécipitation, le pH évolue sensiblement et induit des variations dans les efficacités de chargement des antibiotiques. Alors que la limite de solubilité de la LVX est la plus faible à pH 8,5 (5 mM de bicarbonate)²⁶⁴, son efficacité de chargement n'a pas été améliorée. En revanche, la limite de solubilité de la RIF diminue lorsque le pH baisse²⁶⁵⁻²⁶⁸, favorisant son chargement dans les NP. La concentration en bicarbonate retenue pour la formulation de NP-RIF est donc 2 mM (pH 8), menant à des formulations stables (pH > pKa de l'amine) et avec une efficacité de chargement élevée (proche de 90%). Enfin, en adsorbant des polymères hautement cationiques comme la PLL à la surface de ces NP, leur charge de surface s'inverse vers des valeurs de potentiel zêta très positives, supérieures à +30 mV, assurant la stabilité entre NP²⁶⁹.

1.4. Matériel & méthodes

1.4.1. Synthèse d'i-Particles® et fonctionnalisation

Les NP d'acide poly-(D,L)lactique (PLA, 45-80 kDa, Merck, Figure 45) ont été synthétisées par une méthode de nanoprécipitation adaptée de Fessi *et al.*²⁷⁰ ne nécessitant

pas de surfactants. Le PLA a été dissous à 2% dans une phase organique composée d'acétone (Carlo Erba) qui a été coulée par un goutte-à-goutte rapide dans une phase aqueuse composée d'eau purifiée (OTEC, Aguetant) ou d'une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium (Fisher Scientific) dans différentes concentrations (0,5 à 50 mM) ainsi que d'éthanol (Carlo Erba) en proportion 4:6 (v/v), sous agitation modérée. De l'eau a finalement été ajoutée dans le mélange après coulée et les solvants organiques ont ensuite été évaporés sous basse pression à l'évaporateur rotatif (Rotavapor R210, Buchi) à 30°C. Les suspensions de NP ont ensuite été stockées à 4°C.

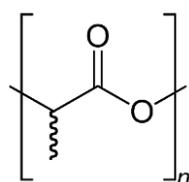


Figure 45. Structure chimique du PLA

Pour leur chargement dans les NP, la clarithromycine (CLR, 748 Da, Sigma Aldrich), la levofloxacin (LVX, 361 Da, Sigma Aldrich) et la rifampicine (RIF, 823 Da, Euromedex) ont été dissoutes à des taux de chargement théoriques allant de 1 à 15% dans la phase organique contenant le PLA avant de procéder à la coulée dans la phase aqueuse.

$$\text{Taux de chargement théorique} = 100 \times \frac{\text{masse d'antibiotique ajoutée}}{\text{masse de PLA ajoutée}}$$

Pour l'adsorption de biomolécules sur les NP, l' α -poly-L-lysine (PLL, 16 kDa, 100 résidus lysines, Alamanda Polymers) et la DNase I (Sigma Aldrich) ont été dissoutes dans de l'eau ou une solution de bicarbonate de sodium/carbonate de sodium à 2 mM puis mélangées à des NP-RIF volume à volume. Les mélanges ont été mis sous agitation lente sur roue pendant 1h à température ambiante.

1.4.2. Caractérisations physico-chimiques des particules

Le diamètre hydrodynamique des NP et l'indice de polydispersité (IP), correspondant à la distribution en taille des NP, ont été obtenues par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panatycal) en diluant 15 μ L des suspensions de NP dans une solution de NaCl à 1 mM filtrée (0,22 μ m). Le potentiel zêta a été obtenue par mobilité

électrophorétique en cuvette en utilisant le même appareil. Le pH des suspensions de NP a été mesuré à l'aide de bandelettes de papier pH (Thermo Scientific).

Le taux de solide des NP a été mesuré en pesant 100 µL des suspensions de NP avant et après séchage dans des coupelles de pesée.

$$\text{Taux de solide} = 100 \times \frac{\text{masse de suspension après séchage}}{\text{masse de suspension avant séchage}}$$

Les NP ont été observées par microscopie électronique à balayage. Pour cela, une goutte de suspension de NP a été diluée dans de l'eau à un taux de solide de 0,1% et a été déposée sur une lamelle en verre fixée sur un plot métallique (Aluminum mount, Slotted Head, Electron Microscopy Sciences). Elle a ensuite été séchée sous basse pression (Vacuotherm, Thermo Scientific). Du cuivre a été pulvérisé sur les plots à l'aide d'un métalliseur (BAL-TEC MED020, Leica Microsystems), menant à une couche de 10 nm sur les échantillons. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope MERLIN VP Compact (Zeiss, CTµ, Centre Technologique des Microstructures, Lyon 1) avec une tension d'accélération de 10 kV.

1.4.3. Quantification des taux et efficacité de chargement

Les suspensions de NP ont été centrifugées 20 min à 16000 xg. Les surnageants contenant les fractions libres d'antibiotique ont été séparés des culots composés d'antibiotique chargée dans les NP (fractions d'antibiotique chargées). Ces fractions ainsi que des suspensions de NP non centrifugées (fractions d'antibiotique totales) ont ensuite été séchées dans un four à 37°C sous vide (Vacuotherm, Thermo Scientific) pendant 2h. Une méthode de dosage propre à chaque antibiotique a ensuite été utilisée pour quantifier l'antibiotique dans chacune des fractions. On en déduit les paramètres suivants de chargement d'antibiotique dans les NP.

$$\text{Efficacité de chargement} = 100 \times \frac{\text{masse d'antibiotique chargée dans les NP}}{\text{masse d'antibiotique totale}}$$

$$\text{Taux de chargement réel} = 100 \times \frac{\text{masse d'antibiotique chargée dans les NP}}{\text{masse de PLA}}$$

1.4.3.1. Quantification de la clarithromycine

Les fractions de CLR totales, libres et chargées ont été reprises dans du chloroforme (Carlo Erba) afin de dissoudre entièrement le PLA et la CLR. Du méthanol (miscible au chloroforme et dans lequel la CLR est soluble) a ensuite été ajouté pour précipiter le PLA et les tubes ont été centrifugés 5 min à 16000 xg. Les surnageants contenant la CLR ont été analysés par HPLC-UV (Agilent 1100 Series) à l'aide d'une colonne de silice C18 (100 x 4 mm, 5 µm, CLYPEUS, Higgins Analytical). Pour cela, une méthode isocratique a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau à 0,1% de TFA (Sigma Aldrich) et d'acétonitrile (Carlo Erba) à 0,085 % de TFA en proportion respective 53:47 (v/v). Le volume d'injection était de 50 µL, la température fixée à 25°C et le débit était de 1 mL/min. Les pics obtenus ont été détectés à 205 nm pour un temps de rétention de 2 min, et ont été intégrés manuellement pour en dégager les aires. Une gamme étalon de CLR dans le mélange de solvants chloroforme/méthanol en proportion identique aux fractions analysées a été réalisée pour quantifier les fractions analysées. La linéarité a été obtenue de 8 à 512 µg/mL ($R^2 = 0.9998$).

1.4.3.2. Quantification de la levofloxacin

Les fractions de LVX totales, libres et chargées ont été reprises dans de l'acétonitrile (Carlo Erba) afin de dissoudre entièrement le PLA et la LVX. Du méthanol (Carlo Erba, miscible à l'acétonitrile et dans lequel la LVX est soluble) a ensuite été ajouté pour précipiter le PLA et les tubes ont été centrifugés 5 min à 16000 xg. Les surnageants contenant la LVX ont été analysés par spectrophotométrie-UV (Multiskan GO, Thermo Scientific) en microplaque (Greiner) à $\lambda = 298$ nm. Une gamme étalon de LVX dans le mélange de solvants acétonitrile/méthanol en proportion identique aux fractions analysées a été réalisée pour quantifier les fractions analysées. La linéarité a été obtenue de 4 à 128 µg/mL ($R^2 = 0.9998$).

1.4.3.3. Quantification de la rifampicine

Les fractions de RIF totales, libres et chargées ont été reprises dans de l'acétonitrile (Carlo Erba) afin de dissoudre entièrement le PLA et la RIF. Les solutions ont été analysées par spectrophotométrie (Multiskan GO, Thermo Scientific) en microplaque (Greiner) à $\lambda = 480$ nm. Une gamme étalon de RIF dans l'acétonitrile en proportion identique aux fractions analysées a été réalisée pour quantifier les fractions analysées. La linéarité a été obtenue de 8 à 256 µg/mL ($R^2 = 1$).

1.4.1. Quantification des taux et efficacité d'adsorption

Les suspensions de NP-RIF-DNase ont été centrifugées 20 min à 16000 xg et les surnageants contenant les fractions libres de DNase ont été récupérés. Ces fractions ainsi que les solutions mères de DNase utilisées pour les formulations ont été dosées par un test colorimétrique microBCA révélant les protéines. Brièvement, en milieu alcalin, les protéines réduisent l'ion Cu^{2+} et un produit coloré violet se forme lorsque l'acide bicinchoninique chélate l'ion Cu^{1+} formé. Ce produit soluble dans l'eau est proportionnel à la concentration de DNase et se détecte par spectrophotométrie à $\lambda = 562 \text{ nm}$. Une gamme étalon de DNase dans du bicarbonate 2 mM a été réalisée pour estimer les concentrations retrouvées dans les fractions. La linéarité a été obtenue de 16 à 256 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9994$). Les paramètres d'adsorption suivants ont été déduits.

$$\text{Efficacité d'adsorption} = 100 \times \frac{\text{masse de DNase totale} - \text{masse de DNase libre}}{\text{masse de DNase totale}}$$

$$\text{Taux d'adsorption} = 100 \times \frac{\text{masse de DNase totale} - \text{masse de DNase libre}}{\text{masse de PLA}}$$

1.4.2. Analyse statistique

Les données sont montrées comme les moyennes \pm l'écart type de quatre mesures pour une expérience. L'analyse statistique a été réalisée par des tests ANOVA ou des tests-t appariés sur GraphPad Prism 6.0. Une *p-value* $< 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

2. EVALUATION *IN VITRO* DE LA POTENTIALISATION DE LA RIFAMPICINE PAR SON CHARGEMENT DANS DES I-PARTICLES® ET PAR SA COMBINAISON AVEC LA DNASE CONTRE DES BIOFILMS DE *S. AUREUS*

2.1. Impact des i-Particles® et de leur charge de surface sur la délivrance de la rifampicine dans des biofilms de *S. aureus*

Les résultats obtenus dans cette étude ont fait l'objet d'un article soumis à *Journal of Nanobiotechnology* (2020), actuellement en cours de révision.

Les nanoparticules comme système de délivrance ont largement été étudiées ces dernières décennies en thérapeutique. Leur utilisation pour la formulation d'antibiotiques permet notamment d'améliorer les paramètres de pharmacocinétique et de biodistribution de la molécule, de la protéger contre sa dégradation, de cibler les biofilms bactériens, de favoriser la pénétration des antibiotiques dans les biofilms et de délivrer progressivement la molécule en limitant sa toxicité¹⁹⁵. Cependant, la plupart des études disponibles s'intéresse à évaluer la capacité de telles formulations à éradiquer des biofilms sans connaître précisément leur mode d'action²³⁰. Pourtant, la compréhension des mécanismes sous-jacents est essentielle pour optimiser le design de tels systèmes de délivrance et leur fonctionnalité contre les biofilms bactériens. Précisément, les paramètres physico-chimiques des NP et notamment leur charge de surface jouent un rôle crucial dans leur interaction avec les biofilms. Dans la partie précédente, nous avons développé deux formulations à base d'antibiotique, des nanoparticules de PLA chargées en rifampicine possédant une charge de surface négative (NP-RIF) et possédant une charge de surface positive (NP-RIF-PLL) grâce à l'adsorption de la PLL, un peptide cationique. Utilisées comme outil d'analyse par imagerie de fluorescence, des formulations similaires (NP-Dy650 et NP-Dy650-PLL) ont également été développées en remplaçant l'antibiotique par un fluorophore, le Dy650.

Ces formulations ont été caractérisées pour leurs propriétés colloïdales, leur toxicité, leur capacité de chargement en rifampicine et leur profil de diffusion de l'antibiotique hors des NP. Des simulations *in silico* ont été réalisées pour modéliser les interactions entre l'antibiotique, la PLL et les NP, par dynamique des particules dissipatives à l'aide du logiciel Material Studio. L'apport des NP et plus particulièrement de leur charge de surface dans le

traitement de biofilms à *S. aureus* a été évalué sur modèle statique *in vitro*. La capacité des NP à migrer dans des biofilms de *S. aureus* et leur profil de distribution en fonction de leur charge de surface ont été évalués par microscopie confocale en time-lapse à l'aide des formulations contenant le fluorophore. En considérant les limites rencontrées par ces tests en microplaques, des étapes de lavage ont été introduites après 45 min d'incubation des bactéries ou des biofilms avec les traitements à base de NP, en tenant compte que les biofilms bactériens peuvent être soumis à des flux biologiques. Il convient alors de considérer qu'un traitement efficace devrait soit agir très rapidement, avant d'être « lavé » hors du biofilm, soit favoriser le maintien des antibiotiques dans le biofilm pendant un temps plus long sans être éliminé par ces flux. Nos observations mettent en avant les capacités d'interaction des NP en fonction de leur charge avec les bactéries planctoniques, et leurs propriétés d'accumulation dans les biofilms. Ces profils de distribution, d'adhésion aux bactéries et de rétention des NP chargées en rifampicine dans les biofilms sont finalement corrélés avec une meilleure efficacité thérapeutique.

Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic delivery in *Staphylococcus aureus* biofilms

David Da Costa ^{a,b,*}, Chloé Exbrayat-Héritier ^b, Basile Rambaud ^b, Simon Megy ^a, Raphaël Terreux ^a, Bernard Verrier ^a, Charlotte Primard ^b

^a Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR5305, CNRS/Université Lyon 1, Lyon, France

^b Adjuvatis, 7 passage du Vercors, 69007, Lyon, France

* Corresponding author: david.da-costa@adjuvatis.com

Abstract

After the golden age of antibiotic discovery, bacterial infections still represent a major challenge for public health worldwide. The biofilm mode of growth is mostly responsible for chronic infections that current therapeutics fail to cure and it is well-established that novel strategies must be investigated. Particulate drug delivery systems are considered as a promising strategy to face issues related to antibiotic treatments in a biofilm context. Particularly, poly-lactic acid (PLA) nanoparticles present a great interest due to their ability to migrate into biofilms thanks to their submicronic size. However, questions still remain unresolved regarding the impact of their surface charge, firstly on their behavior within a bacterial biofilm, and secondly on the antibiotic delivery and on the treatment efficacy. In the current study, rifampicin-loaded PLA nanoparticles were synthesized by nanoprecipitation.

High and superficial loading of rifampicin, confirmed by an *in silico* simulation, enabled to deliver effective antibiotic doses with a two-phase release, appropriate for biofilm-associated treatments. These nanoparticles were functionalized with poly-L-lysine, a cationic peptide, by surface coating to induce charge reversal without altering the other physicochemical properties and cytocompatibility of these particles. Positively charged nanoparticles were able to interact stronger than negative ones with *Staphylococcus aureus*, under planktonic and biofilm modes of growth, leading to a slowed particle migration in the biofilm thickness and to an improved retention of these cationic particles in biofilms. While rifampicin was totally ineffective in biofilms after washing, the increased retention capacity of poly-L-lysine-coated rifampicin-loaded PLA nanoparticles has been associated with a better antibiotic efficacy than uncoated negatively charged ones. Correlating the carrier retention capacity in biofilms with the treatment efficacy, poly-L-lysine-coated rifampicin-loaded PLA nanoparticles are therefore proposed as an adapted and promising approach to improve antibiotic delivery in *S. aureus* biofilms.

Keywords: biofilm, PLA nanoparticles, antibiotic, delivery, surface charge, interaction

Introduction

Despite a relentless fight against infectious agents that have caused high mortality and morbidity rates all around the world for centuries, the perpetual emergence of new microbes makes infectious diseases a major public health burden representing constant challenges for human survival and life quality²⁷¹. Among these diseases, it is estimated that about 80% of bacterial infections are associated with biofilms¹²⁵. Biofilms are defined as sessile and organized communities of single or multi-species bacteria adhering to biotic or abiotic surfaces and living within an auto-produced matrix of extracellular polymeric substances composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids²⁷². Such lifestyle allows bacteria to escape the immune system and may require up to 1,000 times the minimal inhibitory concentration of antibiotics for an effective treatment, leading to therapeutic failures²⁷³. This biofilm recalcitrance involves two phenomena. On the one hand, acquired by horizontal gene transfer and mutagenesis, antibio-resistance is facilitated under biofilm conditions due to high genetic diversity and sub-inhibitory concentrations of antibiotics exposed to bacteria¹. On the other hand, tolerance toward antibiotics is multifactorial: (1) the biofilm matrix acts as a barrier against antibiotics due to its physicochemical properties, (2) the microenvironment with gradients of pH, oxygen and nutrients can alter antibiotic effects and (3) the presence of persister bacteria which exist in a dormant state and are insensitive to antibiotic treatments. Antibiotic delivery in biofilms is then a challenging task in the fight against biofilms¹⁹⁵.

Nanotechnology for antimicrobial drug delivery has been widely explored over the last few decades^{252,274,275}. Particularly, poly-lactic acid (PLA) and poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) biodegradable nanoparticles (NPs) have attracted a great interest in this field²¹⁰. They can be synthesized by various processes and they result in solid colloidal particles ranging from nanometers to micrometers, allowing the encapsulation or surface adsorption of a wide range of bioactive molecules, either lipophilic or hydrophilic²⁰⁸. They present several advantages thanks to their properties, like biocompatibility, biodegradability and versatility of functionalization²⁷⁶. Also, PLA and PLGA NPs display a high structural integrity leading to highly stable drug delivery systems^{207,277}. Their capacities to improve drug pharmacokinetics and bioavailability, by protecting drug against inactivation by enzymes, by targeting and penetrating biofilms or by favoring a sustained drug release while limiting side effects, make these systems an adapted strategy to treat biofilm infections¹⁹⁵.

While most of the studies focused on the ability of these systems to eradicate biofilms, little is known about their mode of action in biofilms²³⁰. It is yet important to evaluate this fundamental aspect to improve the design and the functionality of these carriers, to efficiently deliver antibiotics in biofilms. Indeed, NP physicochemical properties play a crucial role in the sequential steps responsible for their interaction with biofilms: (1) the transport of NPs to the biofilms, (2) their attachment to the biofilm surface, (3) their migration within the matrix and (4) their accumulation^{230,260}. Physicochemical properties of NPs as drug carriers are mainly determined by their size and their surface properties, especially the surface charge (anionic, neutral or cationic). In term of NP size, Liu *et al.* defined that submicronic NPs were optimal compared to microparticles, better penetrating biofilms considering the size of biofilm water channels, and impeding the recognition by the immune system and body clearance²²⁰. The penetration of NPs has been studied in more details into *Burkholderia multivorans* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, in which the size cutoff of NPs able to penetrate into dense biofilm clusters in larger quantities was around 130 nm among tested diameters ranging from 40 to 550 nm²³⁵. Regarding the NP surface charge, it can be responsible for non-specific biofilm targeting by electrostatic interactions with both bacteria and the matrix, favoring the attachment of NPs to biofilms^{195,230}. Forier *et al.* highlighted that anionic polystyrene NPs of 220 nm in size were able to migrate in biofilms while cationic NPs stuck at the entry of bacteria-packed clusters, hypothesizing that interactions with anionic macromolecules of the matrix, like extracellular DNA, inhibited cationic NP penetration^{278,279}. Likewise, cationic micelles of 80 nm and positively charged silver nanoclusters of 8 nm have been shown to accumulate in biofilms thanks to increased interactions between those positively charged systems and negatively charged bacteria^{217,231}. While negatively charged carriers were washed away from biofilms, cationic ones prevented their wash out by water. The impact of such

antibiotic-loaded NP accumulation in the vicinity of bacteria on their capacity to sustainably deliver effective antibiotic concentrations after washing was demonstrated by Hasan *et al.* on planktonic bacteria²³⁸. After a short contact time, washing fully removed free antibiotic and negatively charged NPs non-interacting with bacteria, leading to bacteria survival. On the contrary, positively charged NPs, which were shown to adhere to planktonic bacteria, were able to provide antiplanktonic activity by locally and sustainably delivering the encapsulated antibiotic to bacteria after washing. The ability of antibiotic-loaded NPs to passively target biofilms by electrostatic interactions may thus represent a predominant point for antibiotic activity. However, this effect remains poorly described in biofilms, despite a great interest^{195,230}.

The aim of this prospective study was to evaluate the impact of surface charge of submicronic PLA NPs on the antibiotic delivery in biofilms, through (1) the ability of negatively and positively charged NPs to interact with planktonic bacteria, (2) their capability to migrate and to accumulate into biofilms, and (3) the effect of this passive targeting and accumulation on the efficacy of antibiotic treatment on planktonic and biofilm modes of growth respectively. *Staphylococcus aureus* was chosen as the biofilm model because of its clinical relevance, where it is involved in various chronic and severe diseases like osteomyelitis, endocarditis, urinary tract infections, implant-associated infections or wound infections²⁸⁰. PLA NPs were loaded with rifampicin (RIF), a broad-spectrum antibiotic including *S. aureus*, and surface functionalized by poly-L-lysine (PLL), a cationic peptide, to reverse negative NP surface charge to positive.

Results

2.1.1. Characterization of drug-loaded and charge-reversed NPs

Nanoprecipitation was used to produce unloaded and drug-loaded NPs without any surfactant or stabilizer. Plain PLA NPs displayed an average size of 118 nm, as measured by DLS, and a zeta potential of -55 mV, characterizing a highly negative surface charge (Figure 46A). The low PDI of 0.07 determined by DLS reflected their relatively narrow NP size distribution. The loading of fluorophore (Dy650) or antibiotic (RIF) did not affect PDI and zeta potential values, but slightly increased the size of NPs. Both RIF, at 2.2% loading rate, and Dy650, at 0.02%, were successfully loaded in PLA NPs, resulting in high loading efficiencies of 90 and 100% respectively. When PLL was adsorbed on the surface of NPs, the mean hydrodynamic diameter increased by 10% to 20% to reach 156 and 162 nm for NP-Dy650-PLL

and NP-RIF-PLL respectively, without major impact regarding their PDI and their drug loading. Their zeta potential switched from -52 and -56 mV for uncoated NPs, to +47 and +40 mV, inducing reversal of NP surface charge when formulated with PLL corona. Morphological observations by SEM confirmed the spherical shape of NPs, with no major impact of drug loading or charge reversal on NP morphology and size distribution (Figure 46B-D).

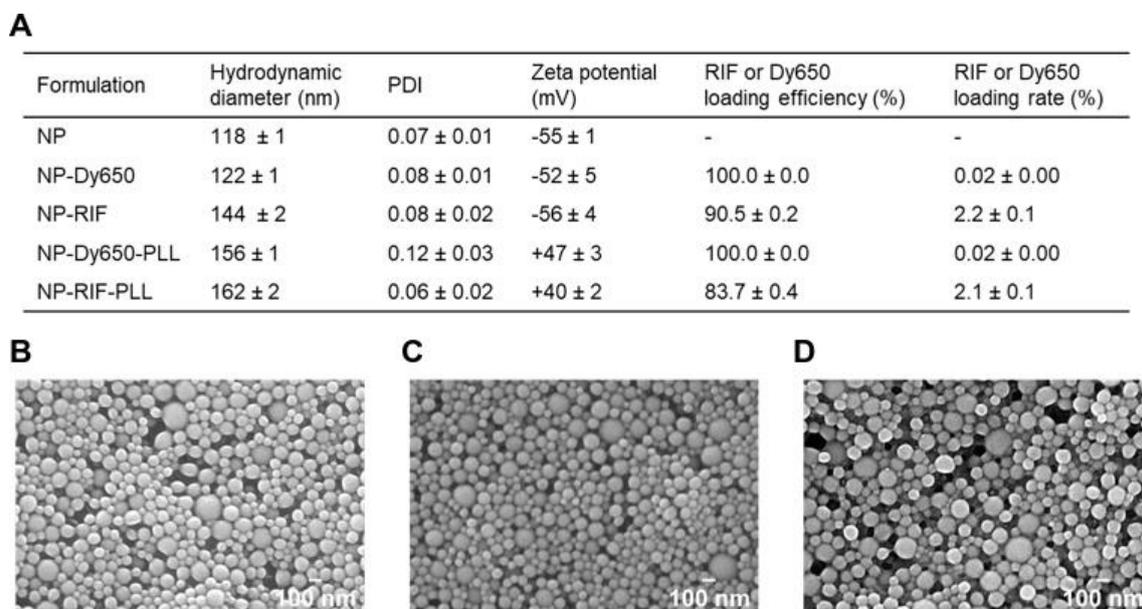
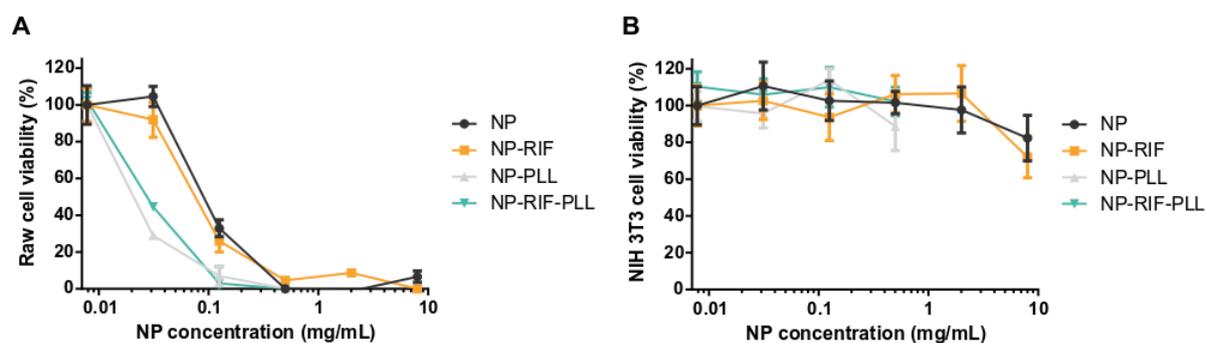


Figure 46. Characterization of NPs functionalized by antibiotic and fluorophore loading and by cationic peptide adsorption. (A) Physicochemical characteristics (hydrodynamic diameter, PDI and zeta potential) and drug loading (loading efficiency and loading rate) of NPs loaded with RIF, Dy650 and PLL. Values are means ± SD of three measurements for one representative experiment out of three independent ones. SEM micrographs of NPs (B), NP-RIF (C) and NP-RIF-PLL (D).

A cell viability evaluation was performed with NP formulations incubated for 24h with murine Raw macrophages and NIH/3T3 fibroblasts, using the PrestoBlue reagent. No toxic effect of any plain or formulated NPs was observed for fibroblasts on the range of tested concentrations. All formulations were toxic for phagocytic macrophages, from 0.031 mg/mL for PLL-coated NP regardless of RIF loading, and from 0.125 mg/mL for non-coated NP and NP-RIF (Additional file 1).



Additional file 1. Cytotoxicity of plain, RIF-loaded and PLL-coated NPs.

Cell viability of murine Raw 264.7 macrophages (A) and NIH/3T3 fibroblasts (B), evaluated by PrestoBlue assay. Percentages are reported to the untreated condition. Values are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of two independent ones.

2.1.2. *In silico* simulation of NP/drug interactions

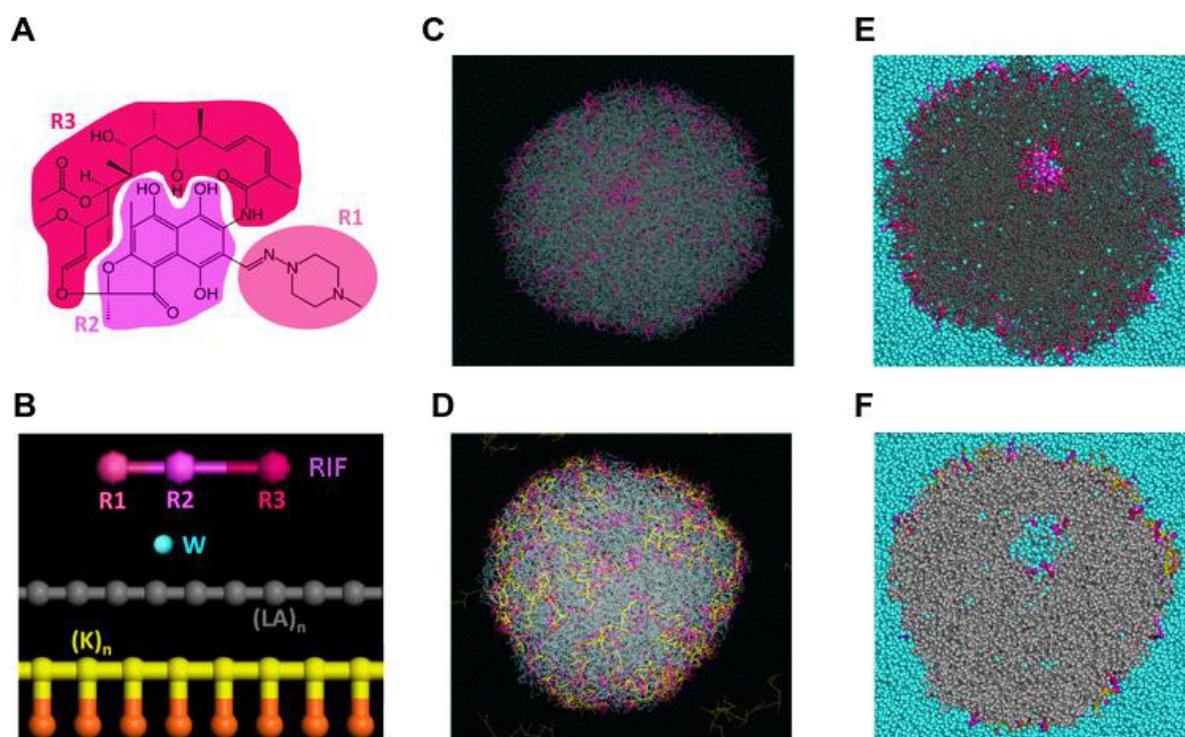


Figure 47. *In silico* simulation of interactions between rifampicin and PLL within NPs.

(A) RIF molecule formula. The groups of atoms corresponding to the R1, R2 and R3 beads are evidenced using colored backgrounds. (B) Schematic representation of the 7 different kind of beads used for the DPD calculations. R1, R2, and R3 for the RIF molecule, water (W) where one bead represents 3 molecules of water, linear chains of lactic acid monomers $(LA)_n$ for the PLA chains and linear chains of lysine $(K)_n$ for the PLL chains, where the yellow beads represent the backbone of the amino acid chain and the orange beads its side chains. End of the simulation after 30 ns of total simulation time for NP-RIF (C) and NP-RIF-PLL (D). Section of a newly formed NP-RIF (E) and NP-RIF-PLL (F).

In silico simulation was performed to further investigate the behavior of RIF and PLL with PLA NPs. DPD simulations allow to model system sizes from nanometers to micrometers and are particularly well adapted to simulate the formulation of compounds within NPs. In order to set up the system and not to create a starting point with an *a priori*, a 130 Å radius droplet was formed with a mixture of water, PLA chains and RIF molecules, where functional groups were set up as beads (Figure 47A-B). A layer of water around the droplet was set up in order to avoid interactions between the droplet and its replicative image. Although some small clusters of RIF molecules stayed occasionally trapped with some water molecules inside the newly formed PLA smooth spherical NP, following a random distribution, most of the RIF molecules were localized at the NP surface (Figure 47C and 47E). The outer RIF molecules were

interacting with the first and second layers of PLA monomers by their R1 and R3 fragments while R2 fragments stayed a little further from the surface. When PLL molecules were added to the water layer surrounding the PLA/RIF/water droplet, most of them ended up located at the surface of the PLA NP with no impact on the RIF behavior (Figure 47D and 47F). PLL chains interacted closely with the PLA chains through their backbone fragments, whereas they interacted with the water and some of the RIF molecules through their side chain parts.

2.1.3. *In vitro* drug release from NPs

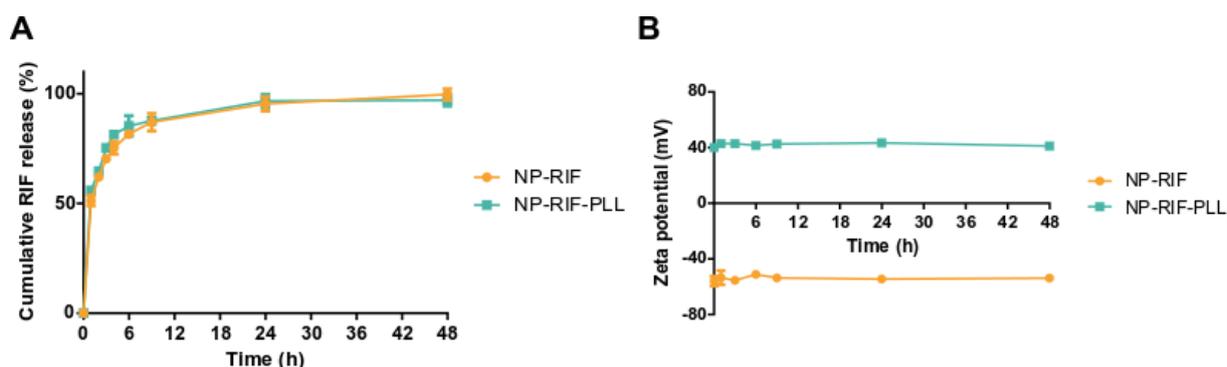
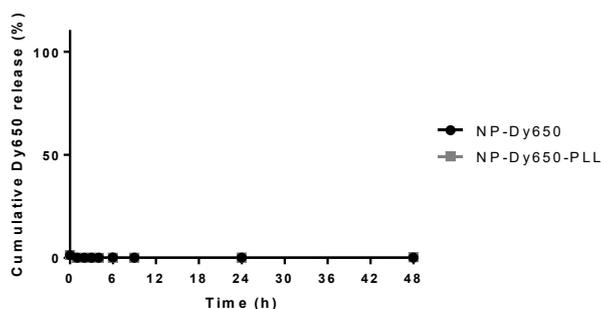


Figure 48. Drug behavior within antibiotic-loaded and PLL-coated NPs in PBS at 37°C.

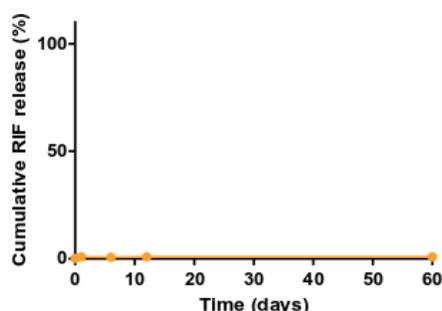
(A) Cumulative release profile of RIF from NPs and PLL-functionalized NPs in PBS at 37°C. (B) Zeta potential evolution of charge-reversed and antibiotic-loaded NPs in PBS at 37°C. Values are means \pm SD of three measurements for one representative experiment out of two independent ones.

In vitro release of RIF from NPs with or without PLL functionalization was followed after their dilution in PBS at 37°C. A similar two-time kinetic was observed for both formulations with a burst release corresponding to almost 80% of loaded RIF on the 6 first hours, followed by a slow and full release of the remaining RIF during 48h (Figure 48A). NP surface charge of both formulations, reflected by zeta potential values, was not modified during 48h in PBS at 37°C (Figure 48B). Moreover, in the same conditions, the fluorophore Dy650 did not release from NPs with or without PLL (Additional file 2).



Additional file 2. Cumulative release profile of Dy650 from NPs and PLL-functionalized NPs in PBS at 37°C. Values are means \pm SD of three measurements for one representative experiment out of two independent ones.

When stored in the bicarbonate buffer at 4°C, no release of RIF from NPs was observed over the investigated period of 60 days (Additional file 3).



Additional file 3. Cumulative release profile of RIF from NPs at 4°C.

Values are means \pm SD of three measurements for one representative experiment out of two independent ones.

2.1.4. Antiplanktonic and antibiofilm properties of charge-reversed and antibiotic-loaded NPs

To evaluate the antiplanktonic activity of the antibiotic under soluble form or formulated with NPs, its minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated by broth microdilution tests performed on planktonic *S. aureus* with serial dilutions of formulations and free drug. Planktonic bacterial growth was inhibited with a MIC of 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for RIF, NP-RIF and NP-RIF-PLL (Figure 49A). PLL, plain NPs and plain NP-PLL did not showed any antiplanktonic activity in the range of tested concentrations (Additional file 4A).

Antibiofilm properties of the antibiotic under soluble form or formulated with NPs were evaluated on *S. aureus* biofilms through 1) its impact on biofilm biomass and 2) its killing activity of bacteria under biofilm mode of growth. The capacity of RIF, NP-RIF and NP-RIF-PLL to degrade biofilms was evaluated by CV staining of the whole biofilm biomass after washing of the unbound biomass. Their ability to kill bacteria within the biofilm was evaluated by MTT colorimetric assay, assessing the metabolic activity of bacteria in unwashed biofilms. RIF only induced a partial biofilm degradation since at least 70% of biofilms remained adhered after 24h of treatment with the highest RIF concentrations compared to non-treated biofilms (Figure 49B). Moreover, RIF partially killed bacteria from biofilms and 40% of their metabolic activity was still present after 24h of treatment with the highest RIF concentrations compared to non-treated biofilms (Figure 49C). Antibiofilm properties of RIF were not impacted by its loading in NPs and by PLL corona on NPs. PLL, plain NPs and plain NP-PLL did not have any antibiofilm activity in the range of tested concentrations (Additional file 4B and 4C).

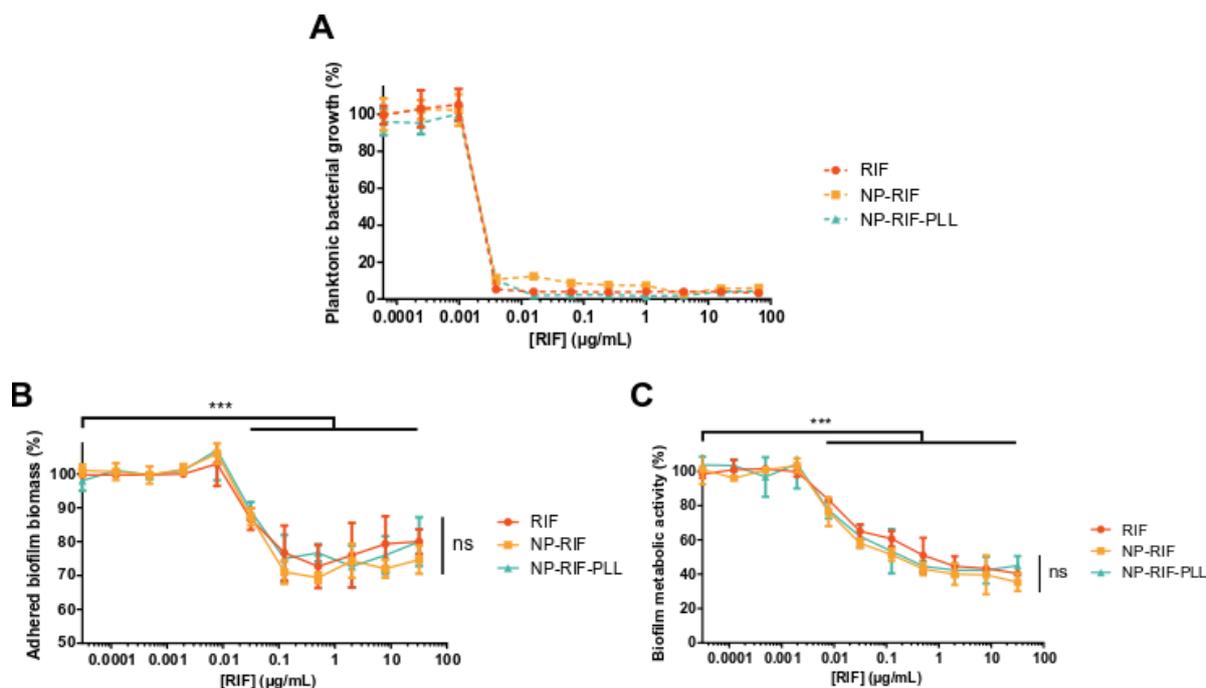
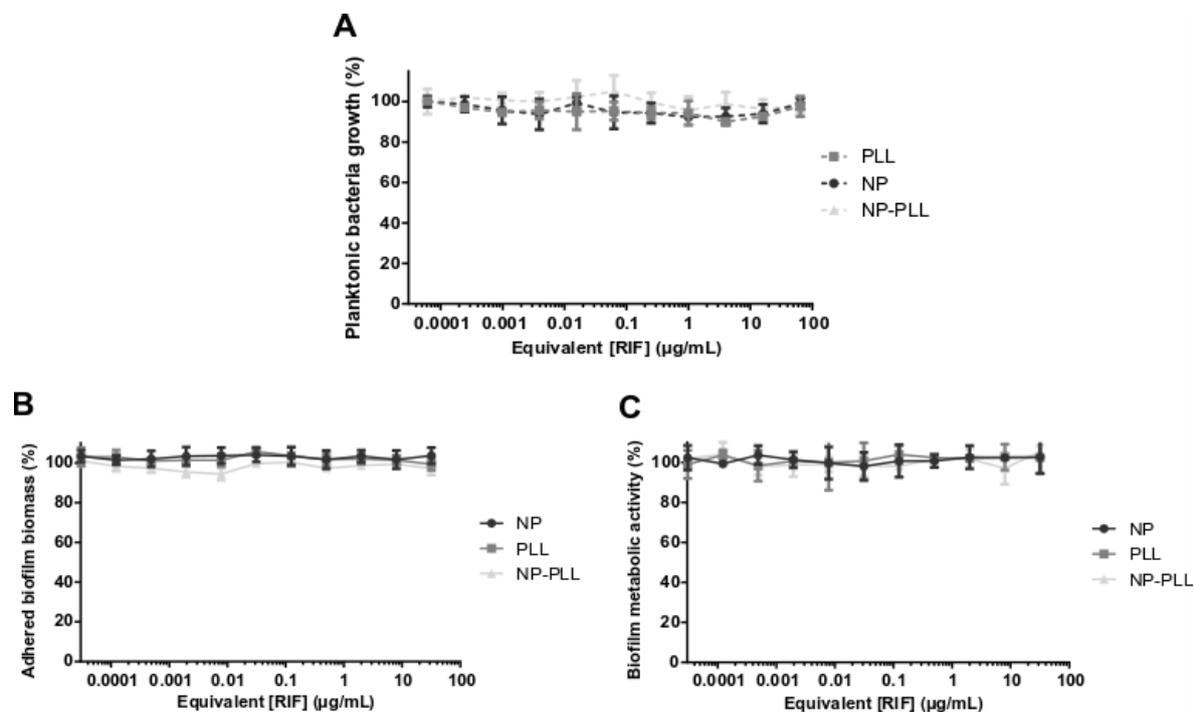


Figure 49. *In vitro* effect of antibiotic in soluble and formulated forms on *S. aureus* under planktonic and biofilm modes of growth.

(A) Planktonic *S. aureus* relative growth after 24h of co-culture with RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL at different concentrations. (B) Relative adhered biomass of *S. aureus* biofilms stained by CV, after 24h of co-culture with different concentrations of RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL on 24h-old biofilms, followed by washing. (C) Relative viability of the bacteria from *S. aureus* biofilms evaluated by MTT, after 24h of co-culture with different concentrations of RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL on 24h-old biofilms. Percentages are reported to the untreated condition. Values are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of three independent ones. Paired *t*-tests (compared to the untreated condition), *** $p < 0.001$. ANOVA (between formulations), ns: not significant.



Additional file 4. *In vitro* effect of PLL, non-coated and PLL-coated NPs on *S. aureus* under planktonic and biofilm modes of growth.

(A) Planktonic *S. aureus* growth after incubation with PLL, plain NPs or plain NP-PLL. (B) Adhered biomass of *S. aureus* biofilms stained by CV, after incubation with PLL, plain NPs or plain NP-PLL and washing. (C) Bacterial viability of *S. aureus* biofilms evaluated by MTT, after incubation with PLL, plain NPs or plain NP-PLL. Percentages are reported to the untreated conditions. NP, PLL and NP-PLL were used in equivalent concentrations to RIF formulations. Values are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of three independent ones.

2.1.5. Increased NP/bacteria interaction by PLL corona enabled to enhance antibiotic delivery to planktonic bacteria

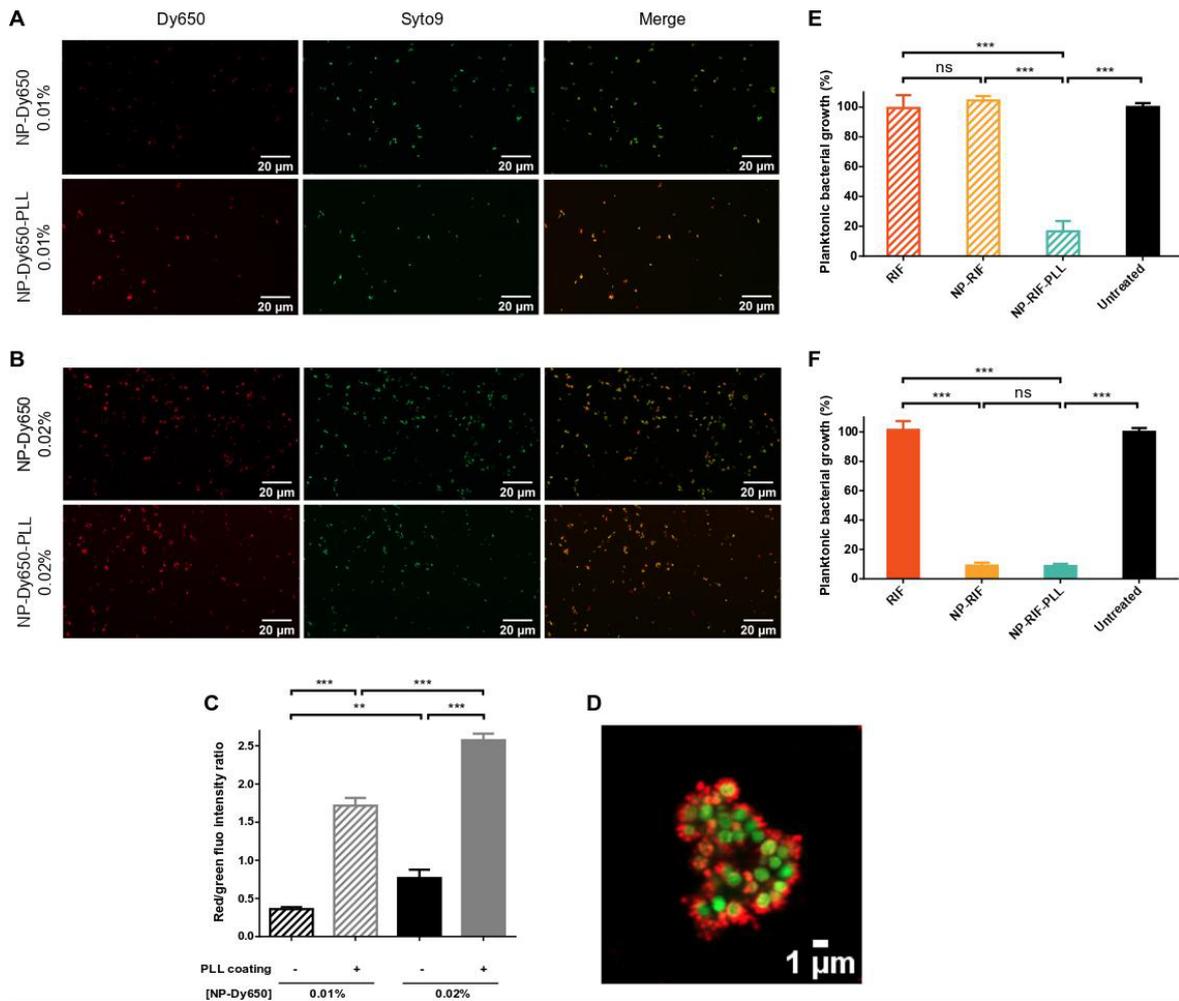


Figure 50. Interaction of NPs and PLL-coated NPs with planktonic *S. aureus*.

CLSM micrographs of NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL (in red) with initial solid contents of 0.01% (A) and 0.02% (B) interacting with Syto9-stained bacteria (in green) for 45 min, followed by washing. (C) Ratio of fluorescence intensities from bacteria-surrounding NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL related to Syto9-stained bacteria. (D) High resolution micrograph by AiryScan detector on CLSM from (B) of NP-Dy650-PLL (in red) interacting with Syto9-stained *S. aureus* (in green). Relative bacterial growth of planktonic *S. aureus* exposed for 45 min to RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL with initial solid contents of 0.01% (E) and 0.02% (F), followed by washing to remove poorly-interacting particles and 24h of incubation. Equivalent RIF concentrations (4 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) were used under soluble form. Percentages are reported to the untreated condition. Each picture represents data obtained with three replicates in three independent experiments. Values are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of three independent ones. ANOVA, ns: not significant, ** $p < 0.01$ and

*** $p < 0.001$.

The capacity of NPs to interact with planktonic *S. aureus* was investigated by confocal microscopy using red-fluorescent NPs (NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL) that were incubated for 45 min with bacteria before washing by selective centrifugations to remove poorly-interacting NPs, followed by green-fluorescent bacteria staining and fixation. The fluorescence intensity from bacteria-surrounding NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL was measured and related to the fluorescence intensity from interacting Syto9-stained bacteria. Globally, both NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL interacted with bacteria. At low NP/bacteria ratio (Figure 50A and 50C), the ratio of red/green fluorescence intensity indicated that NP-Dy650-PLL co-localized almost 4-time more with bacteria than NP-Dy650 that were largely washed away, suggesting more bacterial interactions with PLL-coated NPs. At higher NP/bacteria ratio (Figure 50B and 50C), both NP types co-localized more with *S. aureus*, suggesting a dose-dependent interaction between NPs and bacteria. These interactions between red-fluorescent particles and green-fluorescent bacteria were examined in depth by high-resolution imaging (Figure 50D).

To evaluate the consequences of such interactions on the antiplanktonic efficacy of RIF, an adapted MIC test was carried out. Planktonic *S. aureus* were shortly exposed (45 min) to 4 or 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RIF in soluble or NP-formulated forms (equivalent to 0.01 and 0.02% of initial solid content), followed by washing and 24h of incubation at 37°C in fresh BHI. Planktonic bacterial growth was measured by absorbance at 600 nm. RIF under soluble form did not exert any antiplanktonic activity, as evidenced by levels of planktonic bacterial growth similar to the untreated condition (Figure 50E and 50F), and consequently was effectively washed away from bacteria, although doses 1,000 times greater than MIC were used (see results of MIC in the Figure 49A). At low NP/bacteria ratio (Figure 50E), NP-RIF were unable to inhibit planktonic bacterial growth, meaning that a significant proportion of NP-RIF was washed away and that the remaining part delivered only sub-inhibitory RIF concentrations to bacteria. On the contrary, NP-RIF-PLL, which have been shown to interact more strongly with bacteria, were able to inhibit planktonic bacterial growth, delivering effective RIF concentrations after a short exposition followed by washing. At higher NP/bacteria ratio (Figure 50F), non-coated NP-RIF, interacting more with bacteria, inhibited planktonic bacterial growth as well as PLL-coated NP-RIF. The MIC of RIF was reached despite the washing step, suggesting that such concentrations of NP-RIF and PLL-coated NP-RIF allowed sufficient antibiotic-loaded NP retention by interaction with bacteria, to sustainably deliver effective RIF concentrations, after washing.

2.1.6. Slowed migration of PLL-coated NPs in biofilms

The capacity of NPs to migrate into biofilms was evaluated by confocal microscopy through a kinetic evaluation of red-fluorescent NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL diffusion into

green-stained *S. aureus* biofilms. A time-lapse acquisition to follow NP migration into a deep layer of biofilm was performed, starting 8 min after NP deposition on biofilm surface. NP-Dy650 rapidly, homogeneously and deeply migrated in biofilms within 1h30 (Figure 51A and 51C) while NP-Dy650-PLL stuck at the entry of bacteria-packed clusters in the upper parts of biofilms, inducing a slowest and heterogeneous migration into biofilms (Figure 51B and 51C). Other independent acquisitions taken by a single capture 18h after NP migration into biofilms were carried out to prevent fading of green fluorescence. Within 18h, while NP-Dy650 fully penetrated the whole biofilms, NP-Dy650-PLL were still blocked in the upper parts of biofilms (Figure 51D and 51E).

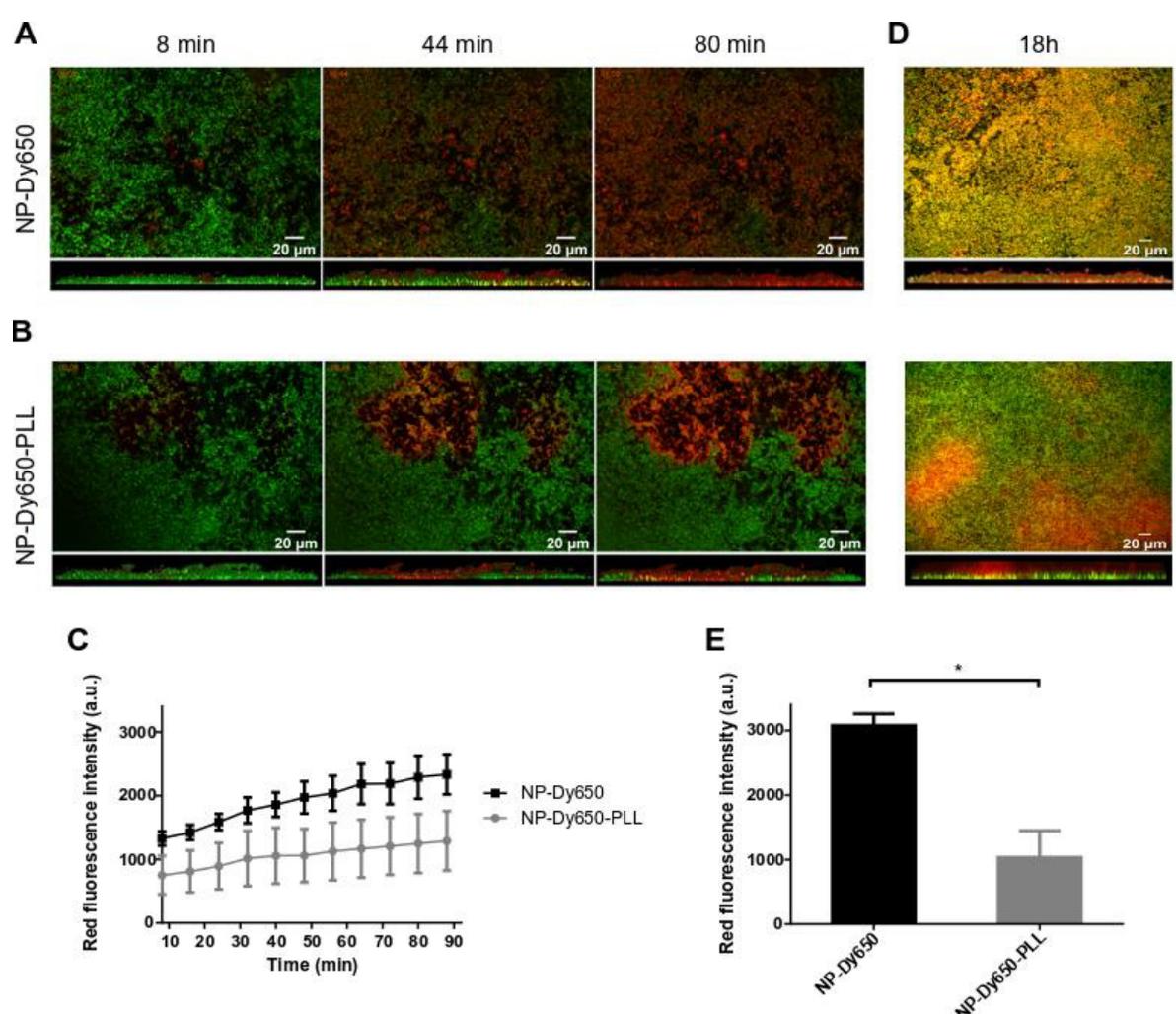


Figure 51. Migration of NPs and PLL-coated NPs in *S. aureus* biofilms.

Time-lapse CLSM micrographs of NP-Dy650 (A) and NP-Dy650-PLL (B) diffusion (in red) into a deep layer of Syto9-stained *S. aureus* biofilm (in green) after 8 (left), 44 (center) and 80 (right) min, with bottom and side views. (C) Kinetic of red-fluorescence NP diffusion into a deep layer of Syto9-stained *S. aureus* biofilm. (D) CLSM micrographs of NP-Dy650 (up) and NP-Dy650-PLL (down) after 18h diffusion into a deep layer of Syto9-stained *S. aureus* biofilm with bottom and side views. (E) Red fluorescence intensity of NPs into a deep layer of Syto9-stained *S. aureus* biofilm after 18h diffusion. Each picture represents data obtained with three replicates in three independent experiments. Values on graphs (C) and (E) are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of three independent ones. Unpaired *t*-test, * $p < 0.05$.

2.1.7. Enhanced NP accumulation by PLL corona improved antibiotic delivery in biofilms

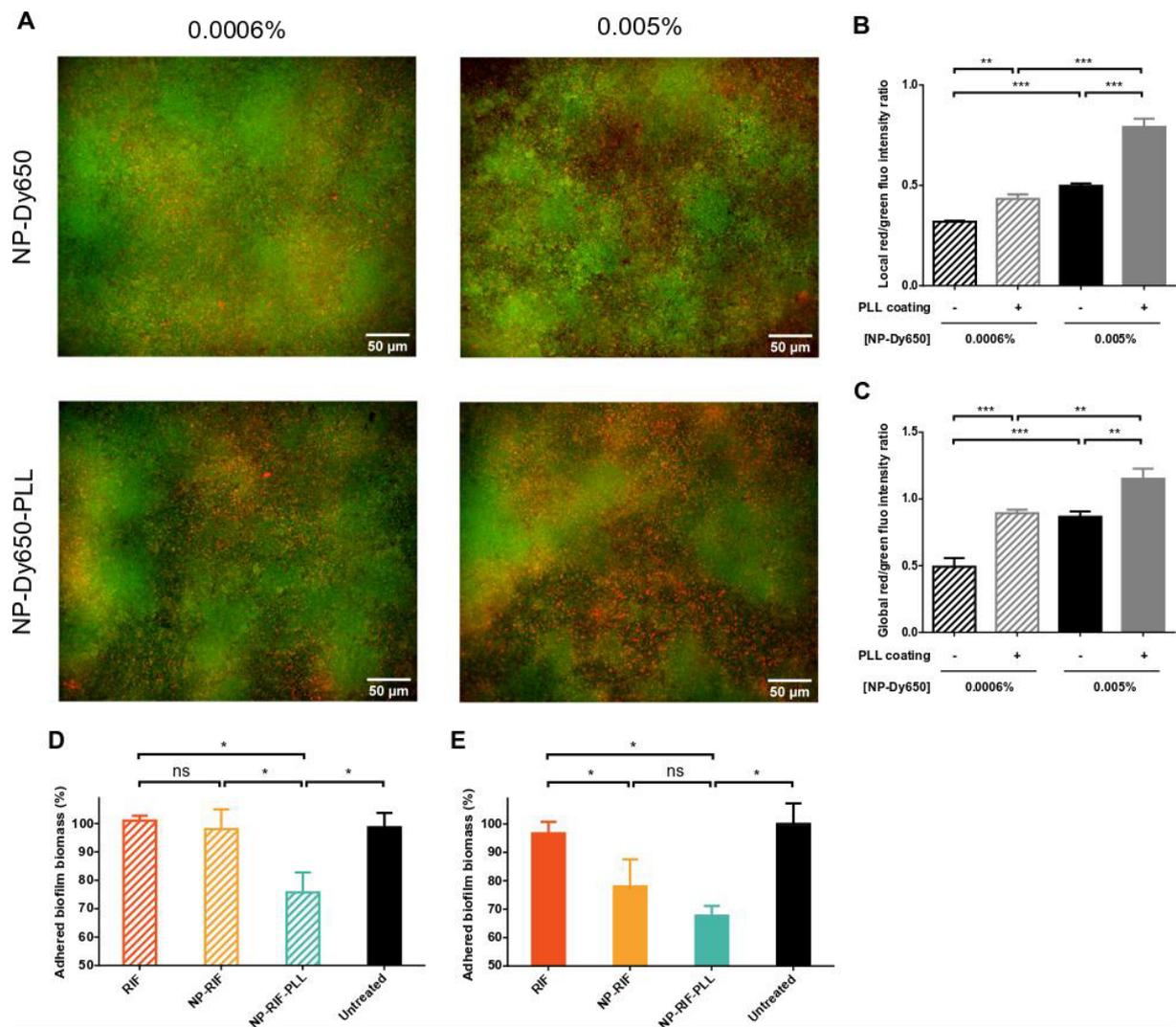


Figure 52. Accumulation of NPs and PLL-coated NPs in *S. aureus* biofilms.

(A) CLSM micrographs of NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL (in red) with initial solid contents of 0.0006% and 0.005% deposited on the top of Syto9-stained biofilms (in green) and shortly incubated (45 min) before washing. Ratio of fluorescence intensities of remaining NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL, related to Syto9-stained biofilms, quantified from CLSM micrographs (B) and from measurements by spectrofluorimetry in microplate wells (C). Relative adhered biomass of *S. aureus* biofilms stained by CV, after 45 min exposure of 24h-old biofilms to RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL with initial solid contents of 0.0006% and RIF concentrations of 0.25 μ g/mL (D) or initial solid contents of 0.005% and 2 μ g/mL of RIF (E), followed by washing to remove poorly-interacting particles and 24h incubation. Percentages are reported to the untreated condition. Each picture represents data obtained with three replicates in two independent experiments. Values are means \pm SD of three replicates for one representative experiment out of three independent ones. ANOVA, ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The highlighted differences in NP/bacteria interaction and in biofilm migration capability of PLL-coated NPs, compared to uncoated NPs, prompt us to assess consequences

on their accumulation in biofilms. Thus, we address this hypothesis by introducing a washing step. The capacity of NPs to accumulate in *S. aureus* biofilms was investigated by confocal microscopy using red-fluorescent NPs (NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL) that were incubated for 45 min with biofilms to allow their penetration in the deep layers (as assessed in Figure 51A and 51B), before washing. Bacteria within biofilms were finally stained using the green fluorophore Syto9 before imaging. The fluorescence intensity from remaining NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL was quantified on CLSM micrographs and related to the fluorescence intensity from Syto9-stained biofilm bacteria (Figure 52B). The assay was replicated using the same experimental plan and the overall fluorescence intensity in wells was measured using a microplate fluorometer. The red/green fluorescence ratios have been represented in Figure 52C. Globally, both NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL accumulated in biofilms (Figure 52A-C). At low solid content, the ratio of red/green fluorescence intensity indicated that NP-Dy650-PLL accumulated almost 1.5-time more in biofilms than NP-Dy650 that were largely washed away, suggesting more interactions between PLL-coated NPs and biofilms. At higher solid content, both NP types were able to accumulate in *S. aureus* biofilms, suggesting a dose-dependent interaction between NPs and biofilms. However, significant higher amounts of cationic NPs remained in biofilms after washing, compared to negatively charged NPs.

We have finally investigated whether the improved antibiotic-loaded NP accumulation had any impact on treatment of biofilms. For this purpose, an adapted CV assay to evaluate biofilm degradation was carried out. *S. aureus* biofilms were exposed for 45 min to 0.25 or 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RIF in soluble or NP-formulated forms (equivalent to 0.0006 and 0.005% of solid content), followed by washing and 24h of incubation. Relative adhered biofilm biomass was finally stained by CV after washing of unbound biomass. RIF under soluble form did not exert any antibiofilm activity, as evidenced by equivalent levels of remaining adhered biofilm biomass to the untreated condition (Figure 52D and 52E), and consequently was effectively washed away from biofilms, despite the high RIF concentrations used which had demonstrated partial antibiofilm efficacy in the absence of washing step (see results in the Figure 49B). At low NP solid content (Figure 52D), NP-RIF were unable to exert any antibiofilm activity. This result means that a significant proportion of NP-RIF was removed by washing, in spite of the high capacity of these uncoated NPs to rapidly penetrate the deep layers of biofilms, as highlighted in the Figure 51A. On the contrary, PLL-coated NP-RIF, which have been shown to accumulate more strongly in biofilms, were able to maintain effective RIF concentrations in biofilms after washing (Figure 52D), reducing the biofilm biomass at the maximal capacity of RIF (Figure 49B). With higher NP solid content, a similar antibiofilm activity was measured using negatively charged PLA-RIF (Figure 52E). However, a significant increase of the amount of antibiotic-loaded NPs by a factor eight was required.

2.1.8. Discussion

Faced with the global burden of bacterial infections related to biofilms and clinical failures of current therapeutics, development of novel strategies is an urgent medical need¹. Reaching effective antibiotic concentrations in biofilms is crucial to prevent recalcitrance phenomena of biofilms¹. Drug delivery systems have largely been studied the last few decades, presenting appropriate abilities for biofilm control²¹⁰. However, the causal links between NP physicochemical properties and therapeutic efficacy in the control of biofilms have not been fully described, in particular with regard to the impact of the surface charge of these NPs.

In the present work, an antibiotic was loaded in submicronic PLA NPs and their surface charge was reversed by adsorption of a cationic molecule. The nanoprecipitation method used in this study to synthesize NPs combines simplicity, speed and low energy input²⁸¹. Productions result in highly reproducible batches and long-term stable and homogeneous NPs regardless of the loading of antibiotic in NPs and the adsorption of the cationic peptide. Precisely, the use of sodium bicarbonate in the aqueous phase of nanoprecipitation enabled to reach a pH 8.0 superior to the pKa of the amine (7.9) present in the molecule of rifampicin, avoiding NP aggregation caused by electrostatic interactions with the negative surface charge of NPs. Molecular modelling provides new insights about the mechanisms of interaction of biologically relevant small molecules formulated with PLA NPs²⁸². The molecule of rifampicin was decomposed in two hydrophobic and one hydrophilic groups by this simplified approach, and a fairly superficial loading of most of the RIF was described with hydrophobic interactions between antibiotic and NPs while the more hydrophilic group stayed close to the NP surface. Only a minority of molecules were deeply encapsulated in the core of NP. These results corroborate with RIF release profile from NPs (Figure 48), characterized by a fast and massive initial burst release, which reflects an encapsulation with a low affinity. Such burst release of the antibiotic allows to rapidly reach concentrations above the MIC, in prevention of recalcitrance phenomena due to biofilm mode of growth and caused by sub-inhibitory antibiotic concentrations¹. Similarly, the coating of PLL resulted in hydrophobic interactions between the backbone of the amino acid chain and the surface of NPs, while positively-charged side chains turned towards the outside of the particle, interacting with the aqueous media. According to the experimental results, it enabled to effectively reverse their surface charge to highly positive values, not impacting NP stability²⁶⁹. The loading of RIF in NPs and the PLL coating on these NPs did not impact antiplanktonic and antibiofilm properties of RIF, consistently with total RIF release under 24h at 37°C. However, cationic NPs were found to be more cytotoxic than negative ones for phagocytic cells (macrophages) while they were non-

toxic for non-phagocytic ones (fibroblasts) in the same range of concentrations. Positively charged NPs are able to induce stronger mitochondrial and lysosomal damages than anionic NPs, preferentially in phagocytic cells, but charge density and hydrophobicity are equally important²⁴⁰.

The benefit of PLL coating onto RIF-loaded PLA NPs lies in the ability of such cationic corona to favor NP interactions with planktonic *S. aureus* (Figure 50A-C). Such non-specific targeting has previously been described for positively charged NPs compared to negative ones, with both Gram-positive and Gram-negative bacteria, suggesting electrostatic interactions with the global negative charge of the bacterial wall among its heterogeneously charged surface^{238,283}. While RIF under soluble form was fully washed from bacteria vicinity, the capability of positively charged NPs to strongly interact with planktonic bacteria enabled to sustainably deliver effective RIF concentrations despite a washing step, and using half quantity that negatively charged ones. Similar results were obtained by Hasan *et al.* using polyethylenimine-coated clindamycin-loaded PLGA NPs. At a solid content of 0.05%, positively charged NPs exerted an antiplanktonic activity after 1h of incubation and washing compared to the free antibiotic and negatively charged NPs, while they were all effective without washing²³⁸.

While the size of NPs influences their ability to diffuse in biofilms, 130 nm of diameter was previously defined as optimal for biofilm penetration compared to bigger NPs^{220,235}. Surface charge of NPs also plays a crucial role for their interaction with biofilms and may be a determinant aspect for the control of bacterial biofilms^{195,230}. Whereas negatively charged PLA NPs rapidly and homogeneously migrated through the whole *S. aureus* biofilms, positively charged NPs bound on the top of the biofilms and at entry of dense bacteria clusters, impeding their penetration deeper into biofilms. This suggests electrostatic interactions between positive NPs and negatively charged biofilm components that are bacteria^{217,231,236} and macromolecules from the matrix like eDNA^{279,284}. However, the fast and widespread migration of uncoated NP-RIF went at the detriment of being easily washed out, while positively charged NPs were retained in greater quantities in the biofilm (Figure 52A-C). Similar electrostatic interactions preventing from wash-out were already described, using micelles, silver nanoclusters or dendrons with different surface compositions^{217,231,236}. However, in each of these studies, no link was established between biofilm accumulation capability and treatment efficacy. After a short treatment time of *S. aureus* biofilms, RIF under soluble form was fully washed away from biofilms and therefore no longer presented any antibiofilm activity. The capability of negatively and positively charged NPs to accumulate in biofilms was correlated with a dose-dependent antibiofilm effect (Figure 52D and 52E). By the effect of surface charge, NP-RIF-PLL sustainably delivered inhibitory RIF concentrations with lower NP concentrations,

reaching an antibiofilm activity similar to that observed without washing (Figure 49B). While the bacterial growth under biofilm lifestyle lead to the failure of current therapeutics, antibiotic inhibitory concentrations have to be greatly increased in biofilms for an effective treatment²¹⁰. Contributing to the maintenance of effective doses by passive electrostatic targeting of NPs is therefore fundamental for the treatment of biofilms. Further animal experimentations represent the next step to validate the potential of this strategy.

Conclusion

Charge-reversed and antibiotic-loaded PLA NPs were designed as strategic tool to treat bacterial infections in a biofilm context, considering the recalcitrance of biofilms toward antibiotics. Stable formulations were successfully synthesized by nanoprecipitation and the size of drug delivery system was chosen to facilitate their migration into biofilms. RIF was highly and superficially loaded into NPs, enabling the delivery of effective antibiotic doses with a two-phase release which is appropriate for biofilm-associated treatments. NP coating with a poly-L-lysine corona inverted surface charge of anionic NP-RIF, leading to positively charged NP-RIF which enabled higher interactions with planktonic *S. aureus* and biofilms than negatively charged NPs. While NP penetration within biofilms plays a crucial role in the biofilm control, this study highlighted the importance of the antibiotic-loaded NP ability to target and to be retained in biofilms. The highest interactions observed with positively charged NPs enabled to retain more antibiotic-loaded NPs in biofilms and to sustainably deliver effective RIF concentrations with lower doses. To our knowledge, this is the first time that a correlation has been established between the ability of NPs to be retained in a biofilm and their anti-biofilm therapeutic efficacy. Efforts can be made to improve these systems and especially reducing their toxicity, for example by surface charge switching using a polymer cationic at acidic pH in biofilms, but anionic at physiological pH. Finally, a better knowledge of the mechanisms governing the efficacy of these systems is a fundamental prerequisite to improve antibiotic delivery in biofilms.

Acknowledgement

The authors acknowledge SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) for CT μ and PLATIM platforms especially Naïma El Kholti, Elodie Chatre and Jacques Brocard for their help. The authors would also like to thank Stavroula Zagkou and Raphaël Forquet for their generous assistance.

2.1.9. Material and methods

2.1.9.1. Preparation of drug-loaded and charge-reversed NPs

Poly(D,L-lactic acid) (PLA, MW = 45-80 kDa, Merck, Switzerland) NPs were synthesized by a surfactant-free process of nanoprecipitation adapted from Fessi *et al.*²⁷⁰. Briefly, the polymer was dissolved at 2% (w/v) in acetone (Carlo Erba, France). This organic phase was flowed by a fast drop-by-drop into an aqueous phase composed of 2 mM sodium bicarbonate (Fisher Scientific, France) and ethanol (Carlo Erba, France) in a 6:4 (v/v) proportion under moderate stirring. Both organic solvents were then evaporated under low pressure by a rotary evaporator (Rotavapor R210, Buchi, France) at 30°C. Final NP suspensions were stored at 4°C.

For their loading into NPs, rifampicin (RIF, MW = 823 Da, Euromedex, France) or a fluorophore (Dy650-decylamide, Dyomics, Germany) were added to the organic phase before processing nanoprecipitation. α -poly-L-lysine (PLL, MW = 16 kDa, Alamanda Polymers, USA) was adsorbed on the NP surface by adding 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ volume to volume in the NP suspension (0.5% of solid content) under slow rotary stirring for 1h at room temperature.

2.1.9.2. Nanoparticle characterization

The solid content of NPs was defined as the proportion (w/v) of PLA polymer into the suspension and was measured by weighing the NP suspension before and after drying.

NP hydrodynamic diameter and size distribution defined by the polydispersity index (PDI) were evaluated by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK) by diluting NP suspensions into a 0.22 μm -filtered 1 mM NaCl solution. Zeta potential was calculated after measurement of the NP electrophoretic mobility using the same apparatus Zetasizer Nano ZS.

NPs were also characterized by morphological observations with scanning electron microscopy (SEM). Briefly, a drop of NPs diluted in water to 0.1% of solid content was deposited on glass coverslips and stuck on metal stubs, before air drying under low pressure. The dried stubs were then sputtered by 10 nm of copper with a metallizer (BAL-TEC MED020, Leica Microsystems, France) before SEM observations (MERLIN VP Compact, Zeiss, CT μ , Centre Technologique des Microstructures, Lyon 1, France) with an acceleration voltage of 10 kV.

2.1.9.3. Drug loading

Charge-reversed and antibiotic-loaded NPs (NP-RIF and NP-RIF-PLL) were centrifuged 20 min at 16,000 xg. The supernatant containing the non-loaded RIF fraction was separated from the pellet, which consisted of the NP-loaded RIF. Both samples were vacuum dried for 2h at 25°C before resuspension with acetonitrile (Carlo Erba, France) in order to fully dissolve PLA and RIF. Solutions were quantified by microplate spectrophotometry (Multiskan GO, Thermo Scientific, France) measuring RIF absorbance at 480 nm and correlating with a linear calibration curve of RIF into acetonitrile ($R^2 = 0.99996$), ranging from 8 to 256 $\mu\text{g/mL}$. The loading efficiency and the loading rate were calculated by the following equations.

$$\text{Loading efficiency} = 100 \times \frac{\text{Mass of loaded RIF into NPs}}{\text{Total mass of RIF}}$$

$$\text{Loading rate} = 100 \times \frac{\text{Mass of loaded RIF into NPs}}{\text{Mass of PLA}}$$

Charge-reversed and fluorophore-loaded NPs (NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL) were centrifuged 20 min at 16,000 xg. The supernatant containing the non-loaded Dy650 fraction and the total NP suspension containing all the Dy650 were directly quantified by microplate spectrofluorimetry (Infinite M1000, Tecan, Switzerland). Fluorescence was measured by excitation at 655 nm and emission at 675 nm. The loaded Dy650 proportion into NPs was calculated by subtracting the non-loaded Dy650 fraction from the total proportion. The loading efficiency and the loading rate were then calculated as described above.

2.1.9.4. Cell toxicity evaluation

Murine macrophages (Raw 264.7, ATCC, USA) and fibroblasts (NIH/3T3, ATCC, USA) were cultured into Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% of fetal bovine serum and 1% of penicillin/streptomycin (DMEM, Gibco, Fisher Scientific, France) at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Briefly, $5 \cdot 10^4$ cells per well were seeded in a 96-well microplate (Corning, Fisher Scientific, France) and incubated for 24h. Then, four-fold serial dilutions of charge-reversed, antibiotic-loaded and plain NPs, ranging from 0.008 to 8 mg/mL of NP concentration, were added and incubated for another 24h at 37°C and 5% CO_2 . Controls containing only cells (untreated) or medium without cells (blank) were also included. Cell viability was evaluated by addition of PrestoBlue reagent (Invitrogen, Fisher Scientific, France) for 2h. Fluorescence was measured by excitation at 535 nm and emission at 615 nm using a

microplate reader (Tecan, Switzerland). Cell viability was assessed as a percentage related to the untreated control.

2.1.9.5. *In silico* simulations

Dissipative Particle Dynamics (DPD) simulations were performed using the Material Studio software (Biovia, United States). For the water molecules (W), a coarse graining approach was used in which one bead represents 3 molecules of water. The radius of the water bead was set to 3.23 Å and its molecular mass to 54 Da. RIF molecules were constructed using 3 different types of beads: R1, R2 and R3. PLA molecules were constructed as linear repetitions of 70 units of lactic acid monomers (LA)_n and PLL molecules were constructed as linear repetitions of 10 units of lysine monomers (K)_n. The lysine molecule itself was constructed using 2 different beads, one for its backbone and one for its side chain. For the calculations, all the solubility parameters δ_i were calculated with the Material Studio software using either the Synthia module for polymers, or models constructed with the Amorphous Cell module, or a combination of both methods. For the models constructed as amorphous cells, all the calculations were performed with the Forcite module using the COMPASS II force field for atom parameters and partial charges. These solubility parameters were then used to calculate the Flory-Huggins interaction parameters χ_{ij} for the corresponding binary mixtures, which were calculated using the relation $\chi_{ij} = (v/RT)(\delta_i - \delta_j)^2$ where R is the gas constant, T the absolute temperature and v the mean volume per mole of the two corresponding components²⁸⁵. The molar volume for each component was determined using the MOE software. The Flory-Huggins interaction parameters were then converted into DPD repulsion parameters a_{ij} , which were obtained using the relation $a_{ij} = 25 + 3.50 \chi_{ij}$ ²⁸⁶. Our calculations were performed using 280³ Å cubic periodic boxes of water as starting points for all the dynamics. Droplets with a radius of 130 Å containing a mixture of water, PLA and RIF molecules were placed at their center. In order to mimic the experimental ratio of PLA and RIF molecules during the NP synthesis, we used a mixture ratio of 137 water molecules versus 81 PLA molecules and 10 RIF molecules, leading to a loading rate of 2%. For the simulations involving PLL chains with a PLL/PLA mass ratio of 1%, the number of RIF molecules was set up at 316 PLL chains for 8100 PLA molecules. DPD experiments were conducted using a time scale of 3 ps and various total simulation times, up to 30 ns.

2.1.9.6. *In vitro* drug release

Charge-reversed and antibiotic-loaded NPs were diluted in 6 mL of phosphate buffer saline (PBS, Gibco, Fisher Scientific, France) and stored at 37°C under mild stirring for 48h. At predetermined times, 300 µL of NP suspension were removed and replaced with fresh buffer to keep the volume constant. The withdrawn samples were centrifuged 20 min at 16,000 xg and rifampicin in the pellets and supernatants was quantified, as described above. Fresh RIF-loaded NPs were stored at 4°C for 60 days to evaluate their drug loading as described above.

2.1.9.7. Bacterial strain and growth conditions

Staphylococcus aureus SH1000 strain was kindly provided by the team Staphylococcal pathogenesis, International Center for Infectiology Research, France. For each experiment, a defrost glycerol stock of *S. aureus* was plated on brain heart infusion (BHI) agar medium (Sigma-Aldrich, France) overnight at 37°C. For planktonic bacteria assays, some colonies were inoculated into BHI liquid medium (Becton Dickinson, France) for 24h at 37°C. For biofilm assays, BHI was supplemented with 1% glucose (Sigma-Aldrich, France). Bacterial growth was then measured by cuvette spectrophotometry (BioPhotometer, Eppendorf, France) at 600 nm.

2.1.9.8. Antibiotic susceptibility test on planktonic bacteria

The minimum inhibitory concentration (MIC) on planktonic *S. aureus* was determined by using the broth microdilution method adapted from Wiegand *et al.*²⁸⁷. Briefly, an overnight culture of *S. aureus* was diluted into BHI to an optical density (OD) of 0.008 at 600 nm corresponding to 1.10^6 CFU/mL and 100 µL of this suspension were dispensed into a non-treated, tissue culture microplate (Corning, Fisher Scientific, France). The same volume of four-fold serial dilutions of RIF or equivalent concentrations into NP suspensions without or with PLL coating (NP-RIF and NP-RIF-PLL), ranging from 0.5 ng/mL to 512 µg/mL was added. PLL, plain NPs and plain NP-PLL were also tested in equivalent concentrations to NP-RIF and NP-RIF-PLL. Controls containing only bacteria (untreated) or medium without cells (blank) were also tested. The microplate was then incubated at 37°C aerobically for 24h and the absorbance at 600 nm was read using a microplate spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, France). The MIC was defined as the lowest drug concentration that prevents planktonic bacterial growth.

2.1.9.9. *In vitro* antibiofilm tests on 24h-old biofilms

Antibiofilm activity of RIF, NP-RIF and NP-RIF-PLL was investigated on *S. aureus* biofilms by crystal violet (CV, Sigma-Aldrich, France) staining. In brief, an overnight culture of *S. aureus* suspension was diluted into BHI supplemented with 1% glucose to an OD₆₀₀ of 0.004 corresponding to 5.10⁵ CFU/mL. Bacteria were seeded into a non-treated, tissue culture 96-well microplate with 100 µL per well and incubated at 37°C aerobically for 24h. After incubation, formed biofilms were washed three times with PBS. The same volume of four-fold serial dilutions of RIF or equivalent concentrations into NP suspensions, ranging from 0.03 ng/mL to 32 µg/mL was added. PLL, plain NPs and plain NP-PLL were also tested in equivalent concentrations to RIF formulations. Controls containing only biofilms (untreated) or medium without cells (blank) were also tested. The microplate was then incubated with treatments at 37°C aerobically for 24h. Wells were washed three times with PBS in order to remove unbound bacteria. Wells were then filled with 120 µL of 0.1% CV and the microplate was incubated for 10 min at room temperature. The excess dye was removed by three washes with PBS and the plate was air-dried. The remaining dye was then solubilized by 100 µL of glacial acetic acid at 33% before reading OD at 590 nm. Adhered biofilm biomass revealed by CV staining corresponded to live and dead bacteria and the matrix, and was assessed as a percentage related to the untreated condition.

Bacterial killing activity of RIF, NP-RIF and NP-RIF-PLL was investigated on *S. aureus* biofilms by MTT (Sigma-Aldrich, France) colorimetric assay. 24h-old biofilms were prepared and treated as for CV assay. After 24h of treatment, MTT at 5 mg/mL was added to reach 10% of the culture medium volume and the microplate was incubated 15 min at 37°C. The resulting formazan crystals were dissolved by 100 µL of a solubilization solution composed of isopropanol (Carlo Erba, France) with 0.25% hydrochloric acid (Sigma-Aldrich, France) and 10% Triton X-100 (Euromedex, France) before reading OD at 570 nm. Biofilm metabolic activity revealed by formazan crystals was correlated to the proportion of live bacteria, and was assessed as a percentage related to the untreated condition.

2.1.9.10. NP interaction with planktonic bacteria and antiplanktonic activity

NP interaction with bacteria was evaluated by imaging techniques. Planktonic *S. aureus* was incubated at OD₆₀₀ of 0.008 with red fluorescent NPs without or with PLL coating (NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL), at initial solid contents of 0.01 and 0.02%, for 45 min at 37°C to allow interactions. Bacteria were then centrifuged for 5 min at 1,500 xg and pellets were

washed two times with PBS to remove non-interacting NPs. Bacteria were finally stained by Syto9 (Invitrogen, Fisher Scientific, France) at 5 μM for 30 min, and 1% agarose (Euromedex, France) was added to immobilize bacteria on the microplate for their observation by a confocal laser scanning microscopy (CLSM, LSM800, Zeiss) equipped with an AiryScan detector to enhance spatial resolution by 1.7 times in the three dimensions. Excitation lasers were 488 nm for Syto9-labeled bacteria and 640 nm for Dy650-fluorescent NPs. The average red/green ratio of fluorescence intensity was calculated by an ImageJ (ImageJ software, National Institutes of Health, USA) macro with an automatic detection of areas containing co-localized red and green signals, on entire micrographs. Fluorescence intensity from bacteria-surrounding NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL was related to the one from interacting Syto9-stained bacteria.

To evaluate the antiplanktonic efficacy of rifampicin-loaded NPs without or with PLL coating (NP-RIF and NP-RIF-PLL) on planktonic bacteria after washing, an adapted MIC assay was performed on a 96-well microplate. RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL were diluted at initial RIF concentrations of 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corresponding to solid contents of 0.01 and 0.02% for NP suspensions, and mixed volume by volume with bacteria at OD_{600} of 0.008 in BHI. Controls containing only bacteria (untreated) or medium without cells (blank) were also tested. After 45 min of incubation at 37°C to enable interactions, bacteria were centrifuged for 5 min at 1,500 $\times g$ and non-interacting RIF or NPs were washed twice with PBS and fresh BHI was added. The microplate was finally incubated for 24h at 37°C and planktonic bacterial growth was assessed by OD_{600} reading as a percentage related to the untreated condition.

2.1.9.11. NP diffusion in biofilms

An *S. aureus* suspension was cultured overnight and diluted into BHI supplemented with 1% glucose (Sigma-Aldrich, France) to an OD_{600} of 0.004. One hundred microliters were added in wells of a 96-well tissue culture non-treated microplate and incubated for 24h at 37°C under aerobic conditions. Formed biofilms were then washed three times with PBS to remove unbound bacteria, and were stained by Syto9 at 5 μM for 30 min. To evaluate NP diffusion through biofilms, 50 μL of NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL with solid contents of 0.25% were carefully deposited by pipetting at the surface of biofilms just prior to CLSM acquisitions (HCS CQ1, Yokogawa). A time-lapse was carried out at 37°C with sequential acquisitions during 1h30 for deep layers of biofilm between +10 and +28 μm from the bottom of the plate. A similar experiment was realized with only one acquisition after 18h incubation and bacteria from biofilms were stained by Syto9 5 μM for 30 min before CLSM acquisitions. Excitation lasers were 488 nm for Syto9-labeled bacteria and 640 nm for Dy650-fluorescent NPs.

Acquisitions were quantified automatically by an ImageJ macro. A thresholding and a binarization of the green signal from biofilms on entire micrographs enabled to delimit the quantification area of red-NP signal through biofilms. The red fluorescence intensity from NPs was then measured.

2.1.9.12. NP accumulation in biofilms and antibiofilm activity

NP accumulation in biofilms was evaluated by imaging techniques. 24h-old *S. aureus* biofilms were prepared as previously described. Red fluorescent NPs without or with PLL coating (NP-Dy650 and NP-Dy650-PLL), at initial solid contents of 0.0006 and 0.005% were carefully deposited on biofilms by pipetting and incubated for 45 min at 37°C to allow attachment. Biofilms were washed two times with PBS to remove non-interacting NPs. Bacteria from biofilms were finally stained by Syto9 at 5 µM for 30 min before CLSM acquisitions (HCS CQ1, Yokogawa). Excitation lasers were 488 nm for Syto9-labeled bacteria and 640 nm for Dy650-fluorescent NPs. Acquisitions were quantified automatically by an ImageJ macro which determines the occupied area and the mean fluorescence intensity from both bacteria and NP signals thanks to an automatic thresholding based on Otsu method by optical section. Fluorescence was also measured using a microplate reader (Tecan, Switzerland) by excitation at 486 nm and emission at 506 nm for Syto9-labeled bacteria and by excitation at 660 nm and emission at 674 nm for Dy650-fluorescent NPs. The average red/green ratio of fluorescence intensity was then calculated.

To evaluate the antibiofilm efficacy of rifampicin-loaded NPs without or with PLL coating (NP-RIF and NP-RIF-PLL) on biofilms after washing, an adapted CV assay was performed on a 96-well microplate. 24h-old *S. aureus* biofilms were prepared as previously described. RIF, NP-RIF or NP-RIF-PLL were diluted at initial RIF concentrations of 0.25 and 2 µg/mL, corresponding to solid contents of 0.0006 and 0.005% for NP suspensions, and 100 µL were poured into wells containing biofilms. Controls containing only biofilms (untreated) or medium without cells (blank) were also tested. After 45 min of incubation at 37°C to enable attachment, biofilms were washed twice with PBS in order to properly remove non-interacting RIF or NPs, and fresh BHI 1% glucose was added. The microplate was finally incubated for 24h at 37°C and adhered biofilm biomass was evaluated by CV staining after washing as a percentage related to the untreated condition.

2.1.9.13. Statistical analysis

Experiments were performed in triplicates and repeated two or three times. Data are shown as means \pm SD for one representative experiment. Statistical analysis was performed using ANOVA, unpaired and paired *t*-test on GraphPad Prism 6.0 (GraphPad software, USA). A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

2.2. Combinaison de la DNase avec la rifampicine contre des biofilms de *S. aureus*

Face à la récalcitrance observée chez les bactéries en biofilms contre les antibiotiques, de nouvelles stratégies adaptées aux propriétés spécifiques que confèrent un biofilm sont en cours de développement. Les agents anti-biofilms ciblent différents mécanismes et molécules impliqués tout au long de la vie d'un biofilm. Précisément, l'ADNe est un composant majeur des matrices de biofilms de *S. aureus* et présente des fonctions essentielles à leur développement¹⁵⁷. Elle est impliquée dans l'adhésion des bactéries à un support, dans l'intégrité structurelle d'un biofilm mature et dans les processus de défense face au système immunitaire et aux antibiotiques.

La DNase I est une enzyme capable de dégrader l'ADN extracellulaire des biofilms bactériens. Elle s'est révélée efficace tant sur des biofilms de *S. aureus* en cours de formation¹⁵⁷, que sur des biofilms préformés dont elle peut réduire la biomasse¹⁵⁶. Toutefois elle ne présente pas d'activité bactéricide, son utilisation avec un antibiotique est donc essentielle. Il a été démontré que la combinaison avec la DNase permet notamment de sensibiliser l'activité bactéricide de la rifampicine, réduisant la charge bactérienne d'un biofilm de *S. aureus* par rapport à l'antibiotique seul, sans toutefois éradiquer entièrement le biofilm¹⁵⁶. Les avantages conférés par l'action sensibilisante et complémentaire de la DNase, combinés avec le chargement de la rifampicine dans des nanoparticules chargées positivement, pourraient donc faire de cette thérapie combinatoire une stratégie adaptée à la lutte contre les biofilms bactériens.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer *in vitro* l'apport de la DNase en combinaison avec de la rifampicine (formulée dans des NP anioniques ou cationiques) pour lutter contre des biofilms de *S. aureus* à toutes les étapes du cycle de vie :

- Sur les bactéries planctoniques, en déterminant les CMI et CMB,
- Sur l'adhésion des bactéries à un support, grâce au Biofilm Ring Test[®],
- Sur la biomasse de biofilms en formation et préformés, par quantification au Crystal Violet,

- Sur la viabilité bactérienne au sein de biofilms préformés, par évaluation de l'activité métabolique des bactéries au MTT et de la biomasse par *live/dead* au confocal.

2.2.1. Activité antibactérienne sur *S. aureus* planctonique

La capacité de la DNase et de la rifampicine sous forme libre ou formulée dans des NP chargées négativement (sans PLL) ou positivement (avec la PLL en surface) à inhiber la croissance de bactéries *S. aureus* planctoniques a été évaluée par test de microdilution en bouillon dans du BHI, milieu de culture adapté à la croissance planctonique de la souche de *S. aureus* étudiée. Il permet d'en déduire la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une molécule, valeur à partir de laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée sur 24h. Après étalement sur gélose et incubation 24h supplémentaires des puits résultant du test de CMI, la concentration minimale bactéricide (CMB) est estimée, valeur à partir de laquelle les bactéries ont été tuées et aucune pousse bactérienne n'a été observée.

	RIF	NP-RIF	NP-RIF-PLL	NP	PLL	NP-PLL	DNase	RIF+DNase
CMI (µg/mL)	0,004	0,004	0,004	> 256	> 256	> 256	> 256	0,004
CMB (µg/mL)	0,125	0,125	0,125	> 256	> 256	> 256	> 256	0,125

Tableau 12. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de la RIF seule, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou combinée avec la DNase

Evaluation sur *S. aureus* planctonique après 24h de co-culture dans du BHI avec des concentrations croissantes de RIF ou DNase suivie d'étalements sur gélose. Pour la combinaison, les CMI et CMB ont été évaluées avec des concentrations croissantes de RIF et de la DNase à 256 µg/mL. Les valeurs sont issues de trois mesures pour une expérience représentative parmi trois indépendantes.

La CMI de la RIF a été évaluée à 0,004 µg/mL et sa CMB à 0,125 µg/mL (Tableau 12). Le chargement de RIF dans des NP présentant ou non la PLL en surface n'a pas impacté ses propriétés anti-planctoniques, les NP, la PLL et la NP-PLL ne présentant pas d'activité inhibitrice ou mortelle vis-à-vis de *S. aureus* sur le range de concentrations testées (< 256 µg/mL). La DNase ne présente pas non plus d'activité anti-planctonique sur ce même range, que ce soit pour l'inhibition de la croissance ou la mortalité de *S. aureus*. En combinant des concentrations croissantes de RIF avec une concentration élevée de DNase (256 µg/mL), les valeurs obtenues de CMI et de CMB de la RIF sont similaires à celles de la RIF seule.

2.2.2. Inhibition de l'adhésion de *S. aureus*

L'activité potentielle de la DNase et de la rifampicine à inhiber l'adhésion de *S. aureus*, première phase de formation d'un biofilm, a été évaluée à l'aide du Biofilm Ring Test®. Pour cela, des bactéries planctoniques de *S. aureus* ont été cultivées sur une microplaque dans un milieu de culture composé de BHI et de billes magnétiques, avec des concentrations croissantes de RIF, libre ou formulée, et de DNase, seule ou combinée avec la RIF. Après 3 heures d'incubation à 37°C, la microplaque est déposée pendant 1 minute sur un support permettant d'aimanter individuellement les puits de la microplaque. Lorsque *S. aureus* adhère à la plaque, les billes magnétiques en co-culture sont immobilisées et ne peuvent plus se déplacer lors de l'aimantation, aucun signal n'est observé au fond du puits. A l'inverse, lorsque l'adhésion de *S. aureus* est inhibée, les billes magnétiques se rapprochent vers le centre du puits lors de l'aimantation et forment un spot quantifiable. La concentration minimale inhibitrice de biofilm (CM Ib) d'une molécule est définie comme étant la valeur à partir de laquelle l'adhésion bactérienne est entièrement inhibée par une molécule (Figure 53).

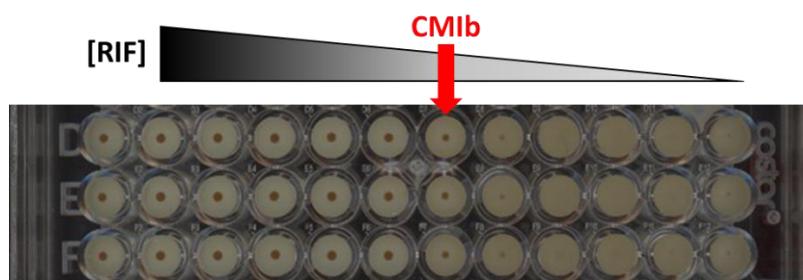


Figure 53. Exemple de résultat obtenu avec le Biofilm Ring Test®

Après 3h de culture dans du BHI avec des concentrations croissantes de RIF et aimantation des billes, un spot quantifiable se forme au centre des puits lorsque *S. aureus* n'adhère pas. La CM Ib est définie comme la concentration minimale d'antibiotique entraînant l'apparition franche d'un spot.

La CM Ib de la RIF a été évaluée à 0,004 µg/mL, valeur identique à sa CMI, suggérant que la RIF a empêché l'adhésion de *S. aureus* par inhibition de sa croissance (Tableau 13). Sa formulation dans des NP présentant ou non de la PLL n'a pas impacté sa CM Ib, les NP, la PLL et les NP-PLL ne présentant pas d'activité anti-adhérente de *S. aureus* sur le range de concentrations testées (< 256 µg/mL). La DNase ne possède pas non plus d'activité anti-adhérente de *S. aureus* sur ce même range et sa combinaison avec la RIF n'a pas impacté la CM Ib de l'antibiotique.

	RIF	NP-RIF	NP-RIF-PLL	NP	PLL	NP-PLL	DNase	RIF + DNase
CMib ($\mu\text{g/mL}$)	0,004	0,004	0,004	> 256	> 256	> 256	> 256	0,004

Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices de biofilms (CMib) de la RIF seule, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou combinée avec la DNase

Evaluation au Biofilm Ring Test® sur *S. aureus* après 3h de co-culture dans du BHI avec des concentrations croissantes de RIF ou DNase. Pour la combinaison, la CMib a été évaluée avec des concentrations croissantes de RIF et de la DNase à 256 $\mu\text{g/mL}$. Les valeurs sont issues de trois mesures pour une expérience représentative parmi trois indépendantes.

2.2.3. Activité anti-biofilm sur des biofilms en formation et préformés

La capacité de la RIF ou de la DNase à dégrader des biofilms de *S. aureus* en formation ou préformés a été étudiée par marquage au Crystal Violet de la biomasse adhérente. Brièvement, des concentrations croissantes de RIF, libre ou formulée, et de DNase, seule ou combinée à de la RIF, ont été mélangées à des bactéries planctoniques ou à des biofilms préformés âgés de 24h, sur une microplaque dans du BHI supplémenté par 1% de glucose, milieu de culture adapté à la croissance de la souche de *S. aureus* étudiée sous forme de biofilms. Après 24h d'incubation à 37°C, les biofilms ont été lavés pour retirer la biomasse décrochée et la biomasse restante adhérente a été marquée par du Crystal Violet, révélant les bactéries vivantes et mortes ainsi que la matrice.

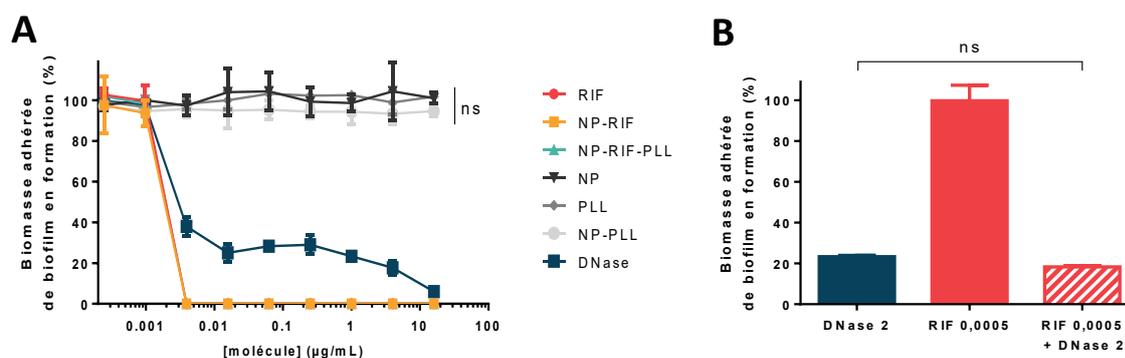


Figure 54. Biomasse adhérente relative de biofilms de *S. aureus* en formation, marquée au Crystal Violet, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B)

Des bactéries planctoniques ont été co-cultivées 24h dans du BHI Glc 1% avec les traitements, puis les biofilms préformés ont été lavés pour retirer la biomasse non adhérente. Le Crystal Violet révèle la biomasse totale du biofilm (bactéries vivantes et mortes et matrice). Les pourcentages sont rapportés à la condition non traitée. Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de trois mesures pour une expérience représentative parmi deux indépendantes. Test ANOVA (conditions comparées entre elles), ns : non significatif.

La RIF, libre et formulée dans des NP présentant ou non la PLL en surface, a inhibé la formation de biofilms de *S. aureus* à partir de 0,004 µg/mL, sa valeur de CMI (Figure 54A). Les NP, la PLL et les NP-PLL ne présentent pas d'activité inhibitrice. A partir de 0,004 µg/mL de DNase, seulement 40% de la biomasse du biofilm néoformé a adhéré par rapport au contrôle non traité et à 16 µg/mL, la quasi-totalité du biofilm est décrochée. La combinaison entre la DNase à concentration efficace et effet antibiofilm partiel (2 µg/mL) et la RIF à concentration sous-inhibitrice (0,0005 µg/mL) n'a pas permis de diminuer la proportion de biomasse adhérente par rapport à la DNase seule à des concentrations similaires (Figure 54B).

Sur biofilms préformés 24h, 75% de la biomasse reste adhérente après action de la RIF à partir de 0,125 µg/mL, valeur de sa CMB (Figure 55A). La formulation de la RIF dans les NP présentant ou non la PLL en surface n'a pas eu d'impact, les NP, la PLL et les NP-PLL ne présentant pas de propriétés anti-biofilms. Concernant la DNase, 0,03 µg/mL sont nécessaires pour qu'il reste 40% de biomasse adhérente, soit environ 10 fois plus que lorsque le biofilm est néoformé. La quasi-totalité du biofilm est décrochée à forte concentration, soit 32 µg/mL (Figure 55A).

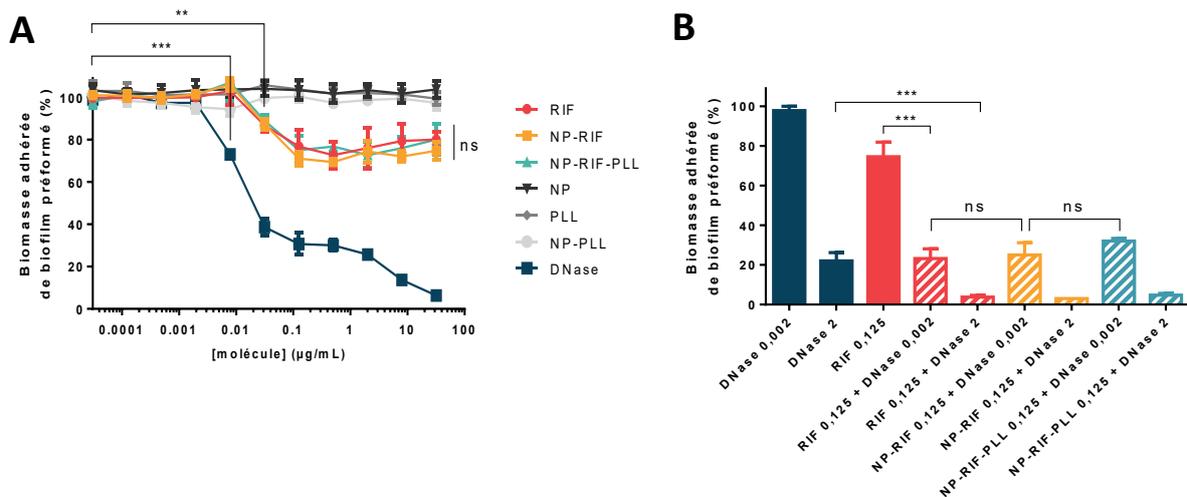


Figure 55. Biomasse adhérente relative de biofilms de *S. aureus* préformés, marquée au Crystal Violet, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B) Des biofilms préformés âgés de 24h ont été co-cultivés 24h supplémentaires dans du BHI Glc 1% avec les traitements, puis les biofilms ont été lavés pour retirer la biomasse non adhérente. Le Crystal Violet révèle la biomasse totale du biofilm (bactéries vivantes et mortes et matrice). Les pourcentages sont rapportés à la condition non traitée. Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de trois mesures pour une expérience représentative parmi trois indépendantes. Tests-t appariés (conditions comparées à la condition non traitée) et test ANOVA (conditions comparées entre elles), ns : non significatif, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

La combinaison de la RIF à une concentration efficace mais ayant un effet anti-biofilm partiel (0,125 µg/mL, 75% de biomasse restante) avec de la DNase en concentration sous-

inhibitrice (0,002 µg/mL, 98%) a permis de réduire très significativement la biomasse du biofilm restant adhérente (23%). En combinant la RIF à la même concentration (0,125 µg/mL) et la DNase à une plus grande concentration (2 µg/mL, 22% de biomasse adhérente), la quasi-totalité du biofilm est décrochée (Figure 55B). En revanche, la formulation de la RIF dans les NP présentant ou non la PLL en surface n'a pas d'impact sur cet effet. Ainsi, la combinaison de la RIF et de la DNase a engendré un effet de potentialisation de la dégradation des biofilms de *S. aureus* préformés par rapport à l'antibiotique ou l'agent anti-biofilm seuls.

2.2.4. Activité antibactérienne sur des biofilms préformés

La viabilité des bactéries au sein de biofilms de *S. aureus* préformés, traités ou non par les formulations, a été évaluée par deux méthodes : une technique fluorescente grâce à un marquage *live/dead* et une colorimétrique par MTT. Pour cela, la DNase et la rifampicine sous forme libre ou formulée dans des NP chargées négativement (sans PLL) ou positivement (avec la PLL en surface) ont été ajoutées dans des biofilms préformés âgés de 24h, et cultivés 24h supplémentaires à 37°C dans du BHI Glc 1%. La première méthode a consisté à révéler la proportion de biomasse bactérienne vivante au sein de biofilms grâce à un marquage *live/dead* par les fluorophores Syto9 et iodure de propidium suivi d'une observation au microscope confocal. Une seconde méthode a été utilisée pour révéler l'activité métabolique des bactéries par ajout de MTT, un sel de tétrazolium jaune réduit en cristaux violets de formazan grâce à l'activité enzymatique d'oxydoréductases bactériennes.

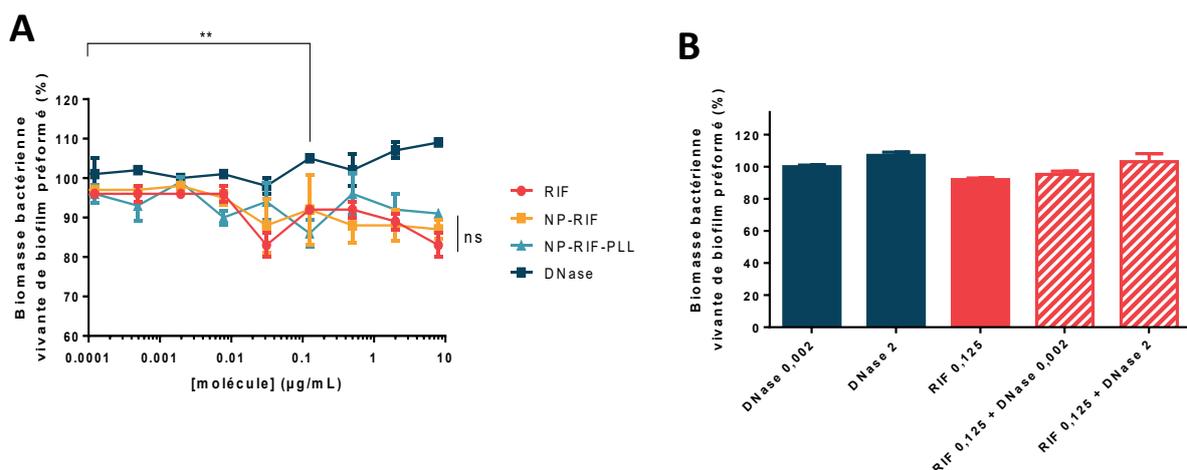


Figure 56. Viabilité bactérienne de biofilms de *S. aureus* préformés, révélée par marquage *live/dead* observé au microscope confocal, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B) Des biofilms préformés âgés de 24h ont été co-cultivées 24h supplémentaires dans du BHI Glc 1% avec une combinaison de RIF et de DNase. Les pourcentages sont rapportés à la condition non traitée. Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de trois mesures pour une expérience représentative parmi au moins deux indépendantes. Test ANOVA, ** p < 0,01.

A partir de 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RIF, soit près de 10 fois sa CMI, la viabilité bactérienne au sein du biofilm n'a réduit que de 10% par rapport au contrôle non traité (Figure 56A et Figure 57) et seulement de 15% pour de fortes concentrations antibiotiques (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En revanche, la DNase tend à stimuler la viabilité des bactéries de biofilms préformés à partir de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La combinaison entre la RIF à concentration efficace (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et la DNase (ayant précédemment démontré une activité anti-biofilm lorsqu'utilisée en combinaison à 0,002 et 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'a pas permis d'améliorer l'activité bactéricide de l'antibiotique en condition de biofilm (Figure 56B).

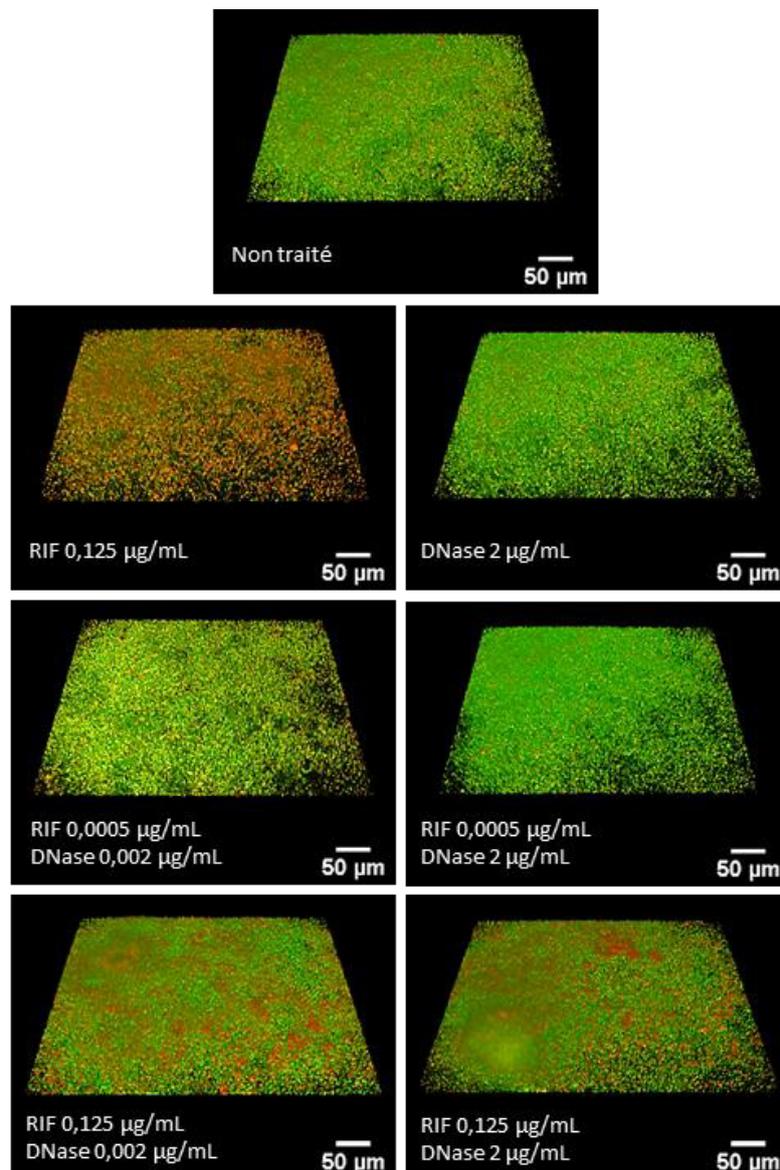


Figure 57. Micrographies de biofilms de *S. aureus* préformés, observés au microscope confocal (marquage *live/dead*) en présence de RIF ou DNase, seules et combinées

Des biofilms préformés âgés de 24h ont été co-cultivés 24h supplémentaires dans du BHI Glc 1% avec de la RIF et de la DNase à diverses concentrations et les bactéries ont été marquées au Syto9 (en vert) et à l'IP (en rouge). Chaque image représente les données obtenues pour un répliquât parmi trois dans trois expériences indépendantes.

L'activité métabolique des bactéries au sein de biofilms préformés a été fortement réduite par l'action de la RIF, jusqu'à 40% du contrôle non traité, pour 32 µg/mL d'antibiotique (Figure 58A). La formulation de la RIF dans les NP présentant ou non la PLL en surface n'a pas eu d'impact, les NP, la PLL et les NP-PLL ne présentant pas de propriétés anti-biofilms. La stimulation de la viabilité bactérienne par la DNase est confirmée par l'augmentation de l'activité métabolique bactérienne au sein des biofilms. En revanche, cette activité n'a pas diminué mais a seulement compensé la stimulation de la DNase suite à la combinaison avec la RIF aux concentrations utilisées précédemment (Figure 58B).

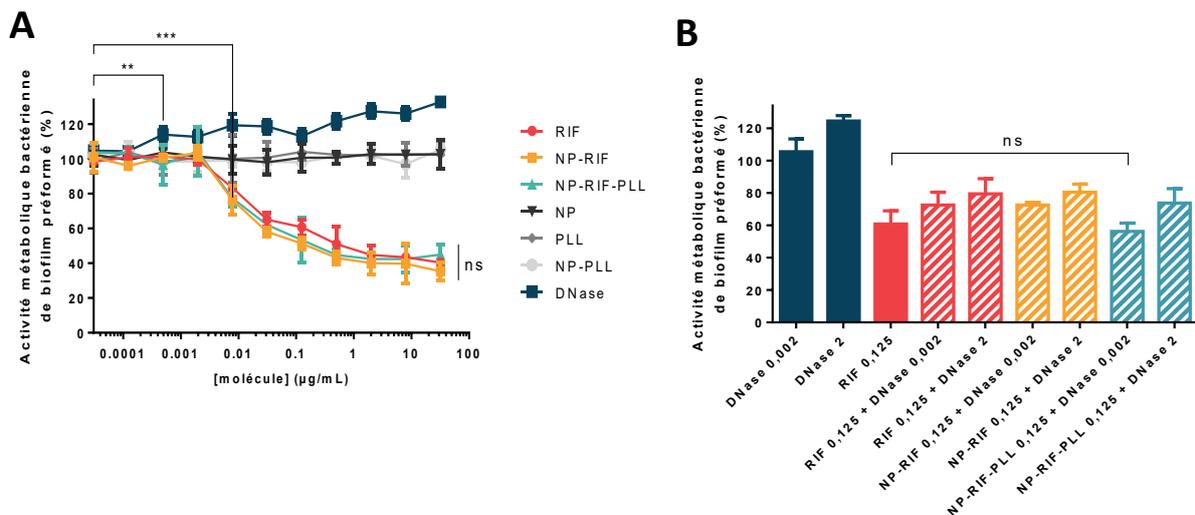


Figure 58. Activité métabolique bactérienne de biofilms de *S. aureus* préformés, révélée par MTT, en présence de RIF, formulée dans des NP avec ou sans PLL en surface, ou de DNase seules (A) ou combinées (B)

Des biofilms préformés âgés de 24h ont été co-cultivés 24h supplémentaires dans du BHI Glc 1% avec des concentrations croissantes de RIF ou DNase. Les pourcentages sont rapportés à la condition non traitée. Les valeurs sont les moyennes \pm l'écart type de trois mesures pour une expérience représentative parmi au moins deux indépendantes. Tests-t appariés (conditions comparées à la condition non traitée) et test ANOVA (conditions comparées entre elles), ns : non significatif, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.2.5. Discussion

La rifampicine est un antibiotique capable d'inhiber la croissance des bactéries planctoniques de *S. aureus* (CMI à 0,004 µg/mL) et de les tuer à plus forte concentration (CMB à 0,125 µg/mL). A travers son activité inhibitrice de croissance, la RIF a permis d'inhiber l'adhésion des bactéries à un support. Sur des biofilms préformés, elle a eu un effet bactéricide partiel, confirmant la capacité de l'antibiotique à pénétrer des biofilms staphylococciques^{102,103} et en accord avec les résultats obtenus dans l'étude de Tetz *et al.*¹⁵⁶. Elle n'a cependant pas la capacité de dégrader efficacement ces biofilms.

La DNase ne présente pas d'activité anti-planctonique (inhibition de croissance, effet bactéricide ou antiadhésif). En revanche, elle est capable de dégrader un biofilm de manière très efficace, probablement par sa capacité à dégrader l'ADNe de la matrice, jouant un rôle crucial dans l'intégrité structurelle des biofilms de *S. aureus*^{39,61}. D'après Izano *et al.*, la DNase disperserait notamment les biofilms en petits groupes de bactéries²⁸⁸. Par ailleurs, 0,004 µg/mL d'enzyme sont nécessaires pour qu'il reste 40% de biomasse adhérente lorsque le biofilm est en formation contre 0,03 µg/mL quand il est préformé, révélant un décalage d'efficacité. En supposant que l'ADNe est libéré progressivement au cours de la formation du biofilm, la capacité de la DNase à dégrader un biofilm dépendrait de l'état de maturation de ce dernier. De plus, on a observé que la DNase a tendance à stimuler la viabilité bactérienne au sein d'un biofilm. Dans une étude menée par Mulcahy *et al.*, il a été démontré que l'ADNe présente une activité bactéricide à des concentrations physiologiques sur *P. aeruginosa* en perturbant et lysant les membranes bactériennes⁷⁴. L'activité de la DNase pourrait donc diminuer cette activité antimicrobienne, induisant l'augmentation de la viabilité des bactéries.

L'antibiotique étant capable d'inhiber la croissance des biofilms et l'activité de la DNase étant dépendante de leur état de maturation, la capacité de l'enzyme à dégrader un biofilm préformé a été potentialisée par sa combinaison avec la RIF. Cependant, l'activité bactéricide de la RIF n'a pas été sensibilisée, contrairement à celle observée dans l'étude de Tetz *et al.*¹⁵⁶. Les auteurs disposaient notamment d'une RIF déjà plus efficace seule par rapport à nos résultats, suggérant une sensibilité à l'antibiotique dépendante de la souche de *S. aureus* étudiée. Des phénomènes de récalcitrance complexes peuvent également entrer en jeu comme l'inactivation de l'antibiotique par les composants et le microenvironnement de la matrice¹⁵⁶ ainsi que la présence de bactéries dormantes¹⁰². L'activité métabolique des bactéries au sein des biofilms de *S. aureus* a notamment chuté de 60% en présence de fortes concentrations de RIF alors que seulement 15% des bactéries ont été tuées.

Les différents tests *in vitro* utilisés dans cette étude sont dit statiques ou fermés, en microplaque^{129,289–291}. A l'opposé des modèles plus complexes, dynamiques ou ouverts, permettant un flux de milieu de culture, nutriments, produits ou déchets dans un réacteur, les conditions expérimentales ne prennent pas en compte les contraintes plus représentatives de la réalité d'une infection par des biofilms au sein d'un organisme^{277,292,293}. Limitant la durée de l'expérience à 24h de traitement et la fréquence d'administration à 1 dose unique, la capacité de la RIF à tuer les bactéries est réduite. La sensibilisation de son effet par la combinaison avec la DNase capable de dégrader des biofilms et par son chargement dans des NP capables d'améliorer la délivrance de l'antibiotique est également difficilement évaluable dans ces conditions. Un modèle d'étude *in vivo* est nécessaire pour déterminer la pertinence et l'intérêt de cette combinaison thérapeutique.

2.2.6. Matériel et méthodes

2.2.6.1. Souche bactérienne et conditions de culture

Une souche de *Staphylococcus aureus* SH1000 a été fournie par l'équipe Pathogénie des staphylocoques, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon. Pour chaque expérience, un stock décongelé de *S. aureus* dans du glycérol a été étalé sur une gélose de Brain Heart Infusion (BHI) agar (Sigma Aldrich) et incubé sur la nuit à 37°C. Pour les essais sur bactéries planctoniques, quelques colonies ont été inoculées dans du milieu BHI liquide (Becton Dickinson) pendant 24h à 37°C. Pour les essais sur biofilms, le BHI a été supplémenté avec 1% de glucose (Sigma Aldrich). La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie en cuvette (BioPhotometer, Eppendorf) à 600 nm.

2.2.6.2. Microdilution en bouillon et étalement sur gélose

La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une molécule sur *S. aureus* planctonique a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon adaptée de Wiegand *et al.*²⁸⁷. Brièvement, une culture de *S. aureus* a été diluée dans du BHI à une densité optique (DO) de 0,008 à 600 nm, correspondant à 1.10^6 UFC/mL et 100 μ L de cette suspension a été dispensée dans les puits d'une microplaque non traitée (Corning, Fisher Scientific). Le même volume de dilutions en série au $\frac{1}{4}$ de DNase (600 UI/mg, Sigma Aldrich) et de RIF (Euromedex) libre ou formulée dans des NP présentant ou non la PLL en surface (NP-RIF et NP-RIF-PLL), de 0,5 ng/mL à 512 μ g/mL, a été ajouté. Des NP, la PLL (Alamanda Polymers) et des NP-PLL ont été testées en concentrations équivalentes aux NP-RIF et NP-RIF-PLL. Pour la combinaison entre antibiotique et DNase, des concentrations croissantes de RIF ont été mélangées à de la DNase à 256 μ g/mL. Des contrôles contenant seulement les bactéries (non traité) ou le milieu sans bactérie (blanc) ont également été testés. La microplaque a été incubée en aérobie à 37°C pendant 24h et l'absorbance à 600 nm a été lue en utilisant un spectrophotomètre pour microplaque (Multiskan GO, Thermo Scientific). La CMI a été définie comme la plus faible concentration empêchant la croissance des bactéries planctoniques.

Après les tests de microdilution en bouillon, la concentration minimale bactéricide (CMB) des molécules a été déterminée en étalant 10 μ L des puits dont la croissance bactérienne était inhibée, sur des géloses de BHI agar, et en les incubant 24h à 37°C. La CMB a été définie comme la plus faible concentration empêchant la croissance bactérienne sur les géloses, c'est-à-dire ayant entraîné la mortalité des bactéries.

2.2.6.3. Biofilm Ring Test®

L'adhésion bactérienne, première phase de formation d'un biofilm, a été évaluée par le Biofilm Ring Test® de la société Biofilm Control²⁹⁴. Pour cela, une culture de *S. aureus* a été diluée dans du BHI à une DO de 0,008 à 600 nm (soit 1.10^6 UFC/mL). Une solution contenant des billes magnétiques (TONER) a été ajoutée à 2% (v/v) dans l'inoculum bactérien. Un volume de 100 µL/puits a été dispensé dans une microplaque non traitée. Le même volume de dilutions en série au ¼ de DNase et de RIF libre ou formulée dans des NP présentant ou non la PLL en surface (NP-RIF et NP-RIF-PLL), de 0,5 ng/mL à 512 µg/mL, a été ajouté. Des NP, la PLL et des NP-PLL ont été testées en concentrations équivalentes aux NP-RIF et NP-RIF-PLL. Pour la combinaison entre antibiotique et DNase, des concentrations croissantes de RIF ont été mélangées à de la DNase à 256 µg/mL. Des contrôles contenant seulement les bactéries (non traité) ou le milieu sans bactérie (blanc) ont également été testés. La microplaque a été incubée en aérobie à 37°C pendant 3h et 120 µL de liquide de contraste ont été ajoutés délicatement à la surface de chaque puits. Elle a ensuite été déposée sur un bloc aimanté de plaque 96 puits pendant 1 min, puis lue par un scanner pour détecter et quantifier les spots centraux de billes magnétiques sur chaque puits (Figure 59). Lorsque les bactéries adhèrent au support, les billes magnétiques ne peuvent se déplacer lors de l'aimantation et aucun spot central ne se forme. A l'inverse, lorsqu'une molécule a pu inhiber l'adhésion bactérienne, les billes sont aimantées vers le centre du puits, formant un spot. La concentration minimale inhibitrice d'un biofilm (CMIb) d'une molécule est définie comme étant la plus faible concentration empêchant l'adhésion totale des bactéries.

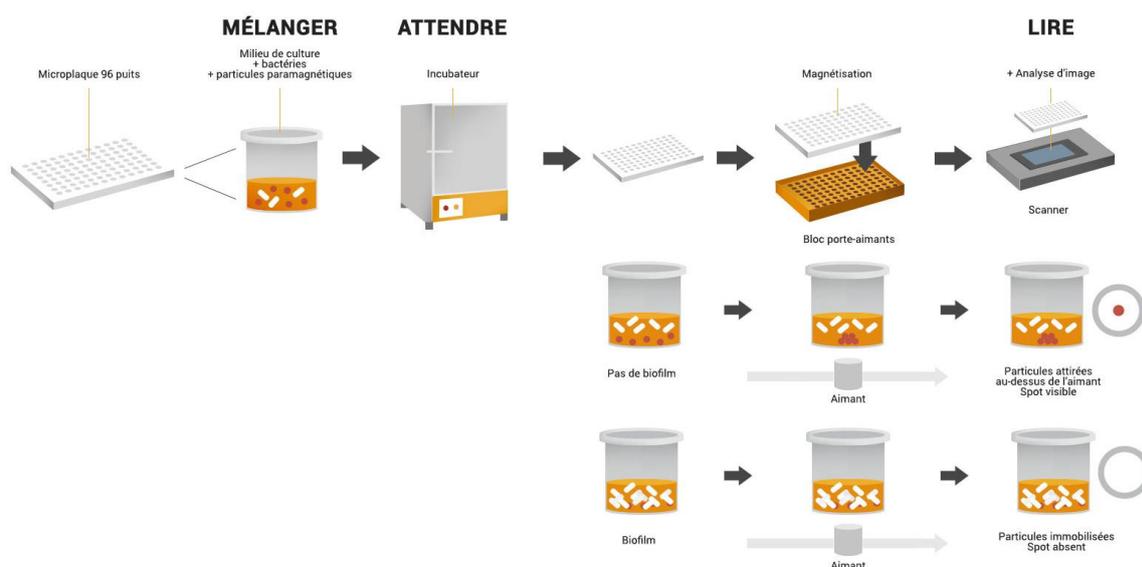


Figure 59. Principe du Biofilm Ring Test® (d'après Biofilm Control)

2.2.6.4. Quantification de la biomasse adhérente de biofilms au Crystal Violet

La biomasse adhérente de biofilms en formation a été évaluée par coloration au Crystal Violet. Brièvement, une culture de *S. aureus* a été diluée dans du BHI supplémenté par 1% de glucose à une DO de 0,004 à 600 nm ($5 \cdot 10^5$ UFC/mL). L'inoculum bactérien a été dispensé dans une microplaque non traitée avec 100 µL/puits. Un volume de 100 µL de dilutions en série au ¼ de DNase et de RIF libre ou formulée dans des NP présentant ou non la PLL en surface (NP-RIF et NP-RIF-PLL), de 0,03 ng/mL à 32 µg/mL, a été ajouté. Des NP, la PLL et des NP-PLL ont été testées en concentrations équivalentes aux NP-RIF et NP-RIF-PLL. Des contrôles contenant seulement les bactéries (non traité) ou le milieu sans bactérie (blanc) ont également été testés. La microplaque a été incubée en aérobie à 37°C pendant 24h. Les puits ont été lavés trois fois avec du PBS (Gibco, Fisher Scientific) dans le but de retirer la biomasse non adhérente. Les puits ont ensuite été remplis avec 120 µL de Crystal Violet (Sigma Aldrich) à 0,1% et la microplaque a été incubée 10 min à température ambiante. L'excès de colorant a été retiré en lavant les puits trois fois avec du PBS et la plaque a été séchée à l'air libre. Le colorant restant a été solubilisé par 100 µL d'acide acétique glacial (Carlo Erba) à 33% avant lecture de la DO à 590 nm par le spectrophotomètre en plaque. La biomasse adhérente des biofilms révélée par le Crystal Violet correspond aux bactéries vivantes et mortes ainsi qu'à la matrice, et a été évaluée comme le pourcentage relatif à la condition non traitée.

Pour mesurer la biomasse adhérente de biofilms préformés, l'inoculum bactérien a été dispensé dans une microplaque avec 100 µL/puits et incubé pendant 24h à 37°C en aérobie afin d'obtenir un biofilm préformé. Les puits ont été lavés trois fois avec du PBS et un volume de 100 µL des stocks de molécules a été ajouté par puits. La microplaque a été incubée en aérobie à 37°C pendant 24h, les puits ont été lavés et la coloration par le Crystal Violet a été réalisée comme précédemment.

2.2.6.5. Evaluation de la viabilité des bactéries en biofilms par fluorescence

La viabilité des bactéries au sein de biofilms préformés a été évaluée par un marquage de fluorophores *live/dead*. Pour cela, l'expérience présentée en § 2.2.6.4 a été répétée. Après 24h d'incubation des stocks de molécules avec les biofilms préformés, les bactéries ont été marquées par du Syto9 (*live*, Invitrogen, Fisher Scientific) à 5 µM et de l'iodure de propidium (*dead*, Invitrogen, Fisher Scientific) à 30 µM pendant 30 min avant acquisition au microscope confocal (HCS CQ1, Yokogawa). La température du microscope a été réglée à 37°C, dans une

atmosphère humide pour éviter la dessiccation des échantillons. Les lasers d'excitation étaient à 488 nm pour les bactéries marquées par le Syto9 et 561 nm pour les bactéries marquées par l'iodure de propidium. Les filtres d'émission étaient à 525/50 nm et 617/73 nm respectivement. Les acquisitions ont été réalisées sur plusieurs couches du biofilm (épaisseur moyenne de 15 à 20 μm avec un espacement entre chaque plan en Z de 1 μm). Les quantifications des biomasses vivantes et mortes ont été réalisées automatiquement par une macro ImageJ (National Institutes of Health) développée en interne, en estimant l'aire occupée par chacun des signaux dans tous les plans du stack. La représentation en 3D a été réalisée à l'aide du plugin *3D viewer* sur FIJI.

2.2.6.6. Evaluation de l'activité métabolique des bactéries en biofilms au MTT

L'activité métabolique des bactéries au sein de biofilms préformés a été évaluée par un dosage colorimétrique au MTT. Pour cela, une culture de *S. aureus* a été diluée dans du BHI supplémenté par 1% de glucose à une DO de 0,004 à 600 nm ($5 \cdot 10^5$ UFC/mL). L'inoculum bactérien a été dispensé dans une microplaque non traitée avec 100 μL /puits et incubé pendant 24h à 37°C en aérobie afin d'obtenir un biofilm préformé. Les puits ont été lavés trois fois avec du PBS et un volume de 100 μL des stocks de molécules (préparés de manière similaire au test par Crystal Violet) a été ajouté par puits. Après 24h d'incubation en aérobie à 37°C, du MTT (Sigma Aldrich) à 5 mg/mL a été ajouté dans les puits pour atteindre 10% du volume de milieu de culture et la microplaque a été incubée 15 min à 37°C. Les cristaux de formazan résultants ont été dissous par de l'acide chlorhydrique (Sigma Aldrich) et 10% de Triton X-100 (Euromedex) avant lecture de la DO à 570 nm par le spectrophotomètre en plaque. L'activité métabolique des bactéries révélée par le formazan est corrélée à la proportion de bactéries vivantes²⁹⁵, et a été évaluée comme le pourcentage relatif à la condition non traitée.

2.2.6.7. Analyse statistique

Les expériences ont été réalisées en tripliquat et répétées deux ou trois fois de manière indépendante. Les données sont montrées comme les moyennes \pm l'écart type de trois mesures pour une expérience représentative. L'analyse statistique a été réalisée par des tests ANOVA ou des tests-*t* appariés ou non, sur GraphPad Prism 6.0. Une *p-value* < 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

3. MISE EN PLACE DE L'ÉVALUATION *IN VIVO* DE L'EFFICACITÉ DE LA COMBINAISON THÉRAPEUTIQUE SUR UN MODÈLE MURIN D'INFECTION D'IMPLANT PAR DES BIOFILMS DE *S. AUREUS*

Les résultats d'évaluation *in vitro* présentés dans cette thèse sont encourageants par plusieurs aspects, mais les modèles utilisés restent limités. En effet, un biofilm *in vivo* est soumis à une dynamique beaucoup plus importante qui ne peut être reproduite en microplaque dans un système fermé. La dernière partie de ce travail de thèse consiste à évaluer *in vivo* sur souris l'efficacité de notre formulation thérapeutique combinatoire.

La possibilité d'augmenter les doses thérapeutiques contrairement aux modèles statiques *in vitro*, à l'aide d'administrations multiples ou sur des périodes prolongées, pourrait permettre de démontrer l'apport des NP cationiques développées dans la sensibilisation de l'activité bactéricide de la rifampicine. Hasan *et al.* ont notamment évalué l'effet d'une formulation de clindamycine chargée dans des particules cationiques sur la viabilité de bactéries dans des biofilms de *S. aureus* (10^8 bactéries injectées) sur un modèle de plaie chez la souris²³⁸. Son administration topique, une fois tous les deux jours, a entraîné l'élimination quasi-complète de la charge bactérienne après 8 jours alors que la moitié seulement est éliminée lorsque l'antibiotique est chargé dans des particules anioniques.

Cette étude *in vivo* pourrait également mettre en avant la potentialisation de l'effet bactéricide de la rifampicine par l'activité de dégradation de la matrice par la DNase. Fleming et Rumbaugh ont par exemple évalué l'éradication de biofilms de *P. aeruginosa* (10^4 bactéries injectées) par une combinaison d'antibiotique (meropenem) et d'enzyme de dégradation de la matrice (glycoside hydrolase) sur un modèle de plaie chez la souris²⁹⁶. L'élimination complète des bactéries était visible après 72h de traitement (1 dose/jour) contre 120h pour l'antibiotique seul. Par ailleurs, ils ont observé la dispersion des biofilms dans l'organisme des souris lorsque l'enzyme était administrée seule²⁹⁶. Sa combinaison avec l'antibiotique a permis de contenir les biofilms au niveau du site d'infection en évitant la colonisation de nouveaux sites par des fragments de biofilms dispersés. La capacité des NP cationiques à interagir avec les bactéries et la matrice des biofilms pourrait notamment augmenter l'action de l'antibiotique encapsulé contre les fragments de biofilms dispersés lors du traitement à la DNase.

Un modèle d'infection de cathéter chez la souris a été développé pour l'évaluation préclinique de l'efficacité thérapeutique anti-biofilm des formulations développées lors de ce travail de thèse. Pour cela, un projet d'expérimentation animale a été soumis et validé par le comité d'éthique régional (CECCAPP) ainsi que par le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Certains outils nécessaires au déroulement de ces expérimentations ont été mis en place. Néanmoins, ce projet devant être initié en mars 2020, il n'a pas pu être mené à son terme suite au confinement lié au Covid-19 et représente la principale perspective de ce travail de thèse.

3.1. Modèle d'infection de cathéter

Un modèle murin d'infection d'implant sous-cutané par des biofilms de *S. aureus* a été développé pour évaluer l'efficacité de notre combinaison thérapeutique. C'est un modèle pertinent par rapport à *S. aureus*, espèce bactérienne majoritairement retrouvée dans les infections associées aux dispositifs médicaux⁸⁴. Il présente les avantages d'être simple à mettre en place, rapide et utilisé dans de nombreuses publications pour évaluer l'efficacité anti-biofilm de diverses thérapies^{234,297-301}. De plus, l'injection des traitements curatifs en sous-cutané directement au niveau du site d'infection permet de limiter leur toxicité générale éventuelle, et notamment celle des NP cationiques, pour se concentrer dans un premier temps sur la preuve de concept de l'efficacité d'une telle combinaison.

Des souris C57BL/6 ont été sélectionnées pour leur capacité de survie dans le cas d'infections à *S. aureus* alors que d'autres types murins comme les Balb/c, plus sensibles, succombent rapidement après l'inoculation des bactéries³⁰². C'est également un modèle de souris couramment retrouvé dans la littérature pour cette application^{297,298}. Elles sont âgées de 7 semaines au début de l'étude pour s'assurer que leur système immunitaire est mature. Il s'agit de femelles pour éviter les problèmes d'agressivité constatés de manière récurrente chez les mâles, pouvant entraîner le retrait de l'agrafe présente au niveau du site chirurgical et la perte de l'implant infecté. Elles sont réparties en groupe de 3 à 6 par cage conventionnelle et sont hébergées suivant un cycle de lumière 12h/12h avec une température et une atmosphère contrôlées. Sur le dos des souris rasé et désinfecté, une incision de 3-4 mm en position latérale à la colonne vertébrale en haut du dos est réalisée et un segment de cathéter stérile de 1 cm de long et de 2 mm de diamètre est alors inséré partiellement sous la peau, similairement aux protocoles utilisés par Stavrakis *et al.* ou Nowakowska *et al.* (Figure 60)^{297,298}. Puis, 20 µL d'inoculum bactérien sont injectés dans la lumière du cathéter, à la dose prédéfinie. L'implant est ensuite inséré entièrement sous la peau et l'incision refermée par une agrafe. Les souris sont ensuite surveillées jusqu'à leur réveil. Tous les jours, les

traitements sont administrés par 2 injections sous-cutanées de 100 μ L de part et d'autre du cathéter en variant les sites d'injection chaque jour. Tous les 2 jours, les aspects cliniques des animaux sont suivis, les souris pesées et le diamètre des œdèmes mesuré. A la même fréquence, un groupe d'animaux est mis à mort par dislocation cervicale et le cathéter est récupéré. Un dénombrement bactérien est ensuite réalisé. La surface de l'implant est également observée au microscope électronique à balayage.

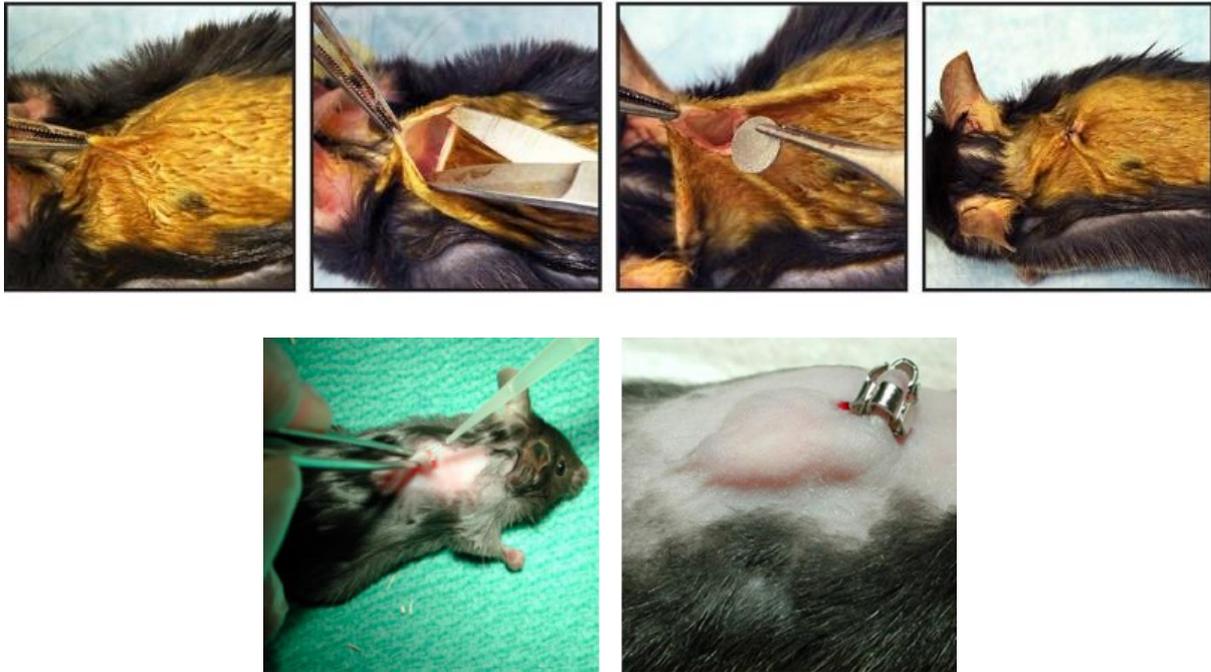


Figure 60. Photographies représentatives des procédures chirurgicales établies dans le modèle d'infection d'implant sous-cutané (adapté de Stavrakis *et al.*²⁹⁷, en haut, et de Nowakowska *et al.*²⁹⁸, en bas)

3.2. Mise au point préliminaire des outils

3.2.1. Capacité d'adhésion des bactéries à l'implant

Des inoculums bactériens ont été dilués à une $DO_{600\text{ nm}}$ égale à 1 ($1,25 \cdot 10^8$ UFC/mL) et 0,1 ($1,25 \cdot 10^7$ UFC/mL) dans du PBS et injectés dans la lumière de cathéters (Nexiva™, Becton Dickinson) stériles de 1 cm de long, puis incubés 24h à 37°C. Les cathéters ont été lavés trois fois avec du PBS pour retirer les bactéries non adhérentes. Dans 1 mL de PBS frais, ils ont été vortexés et soniqués pour détacher les bactéries adhérentes. Des dilutions en cascade au 10^{ème} dans du PBS ont été réalisées et 10 μ L de chaque dilution ont été étalés sur des géloses de BHI agar incubées 24h à 37°C. Les unités formant des colonies (UFC) ont été dénombrées

visuellement lorsque leur nombre était compris entre 30 et 300. La concentration bactérienne d'un implant pour une DO donnée a été définie par l'équation suivante.

$$\text{Concentration bactérienne (UFC/implant)} = F_{\text{dilution}} \times \frac{\text{nombre de colonies comptées}}{\text{volume étalé}} \times V(\text{PBS})$$

Pour l'implantation d'un inoculum de $DO_{600 \text{ nm}}$ égale à 1, la quantité de bactéries adhérentes à l'implant après 24h de culture a été estimée à $1,1 \cdot 10^5$ UFC/implant et pour une DO de 0,1, elle a été estimée à $1,5 \cdot 10^4$ UFC/implant. L'effet dose-réponse est robuste, reproductible et répété. Ces essais préliminaires sont la preuve de la capacité d'adhésion des bactéries *S. aureus* au cathéter sélectionné, de manière dose-dépendante et robuste.

3.2.2. Formulations injectables de rifampicine

Les formulations de NP-RIF, NP-RIF-PLL et NP-RIF-DNase doivent être adaptées pour leur administration *in vivo* afin d'atteindre les concentrations de RIF requises et d'administrer les particules dans une solution osmotique.

Pour atteindre par exemple une dose de RIF égale à 30 mg/kg, 750 µg d'antibiotique sont nécessaires pour une souris de 25 g. En injectant 2 fois 100 µL de traitement en sous-cutané, la concentration de rifampicine doit atteindre 3750 µg/mL. Nous avons démontré précédemment (§ 1.1.3) que de telles concentrations peuvent être atteintes pour des NP-RIF présentant un taux de chargement théorique de 10% malgré une stabilité limitée à quelques jours. Les paramètres d'adsorption de la PLL et de la DNase sont à adapter aux NP-RIF fortement chargées. Les formulations de NP-RIF, NP-RIF-PLL et NP-RIF-DNase doivent également être diluées dans un volume adapté de PBS ou de mannitol afin d'atteindre une concentration osmotique de 300 mOsm/L.

3.3. Procédures expérimentales

Pour réaliser à bien ce projet d'expérimentation animale, trois procédures successives ont été établies (Figure 61). Une nouvelle procédure ne peut être initiée avant que la précédente soit validée.

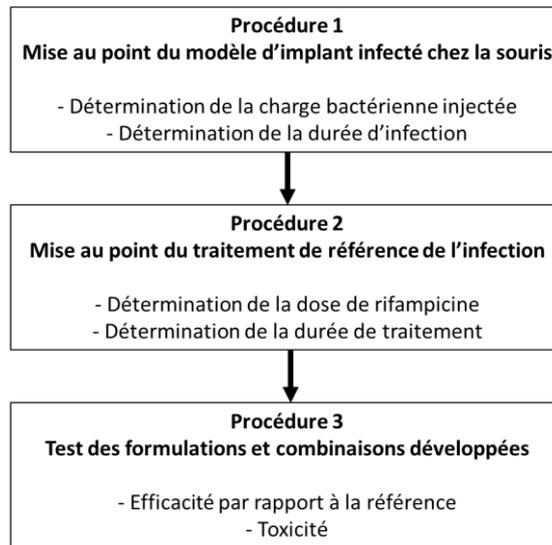


Figure 61. Organigramme des procédures expérimentales pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité et de la toxicité de la combinaison thérapeutique développée

Une première procédure a été réalisée pour mettre au point le modèle d'implant infecté par des biofilms de *S. aureus* chez la souris (Figure 62). Précisément, des paramètres fixes et optimaux ont été définis en terme de charge bactérienne et de durée d'infection de manière à maintenir une charge bactérienne suffisamment élevée ainsi qu'une infection stable et reproductible entre animaux pour avoir des groupes autant homogènes que possible.

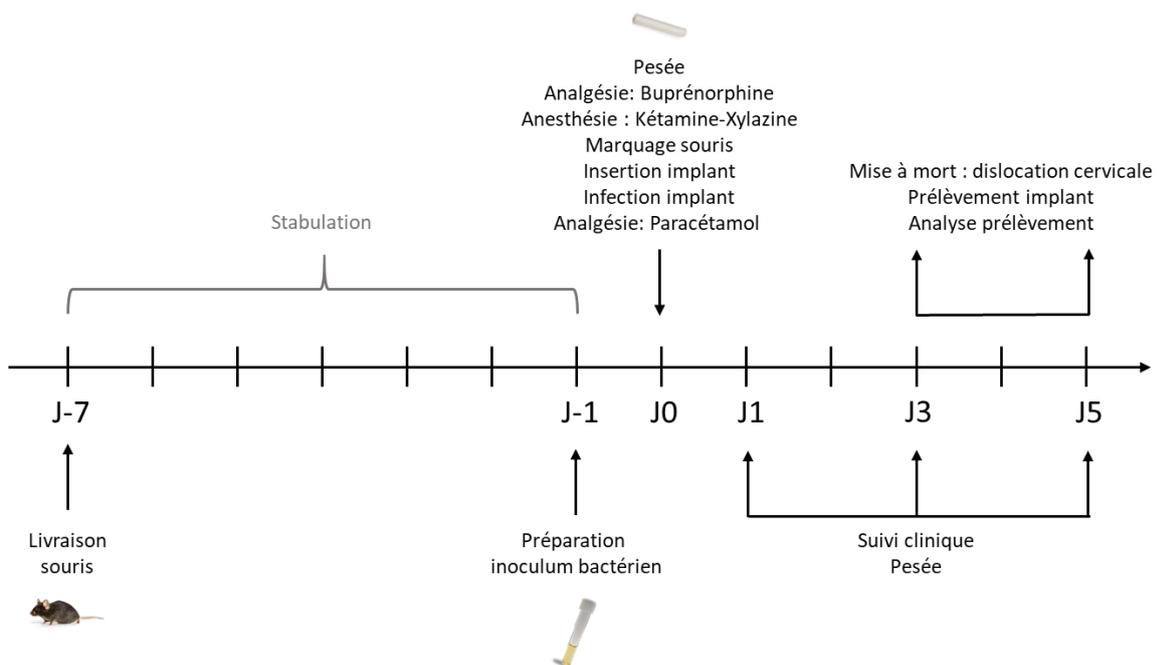


Figure 62. Chronogramme de la première procédure expérimentale

La première expérience de cette procédure a consisté à définir une durée d'infection suffisante pour une charge bactérienne, initialement introduite dans les cathéters, fixe et identique entre les groupes de souris testés. La souffrance des animaux est également considérée et doit être minimisée. Pour cela, 3 groupes de 3 souris ont été traités et analysés pour leur poids, leurs signes cliniques et leur charge bactérienne adhérente à l'implant :

- Le premier groupe a reçu 10^4 UFC/implant pour 3 jours d'infection,
- Le second groupe a reçu 10^4 UFC/implant pour 5 jours d'infection,
- Le troisième groupe (contrôle) a reçu 0 UFC/implant (PBS) pour 5 jours d'infection.

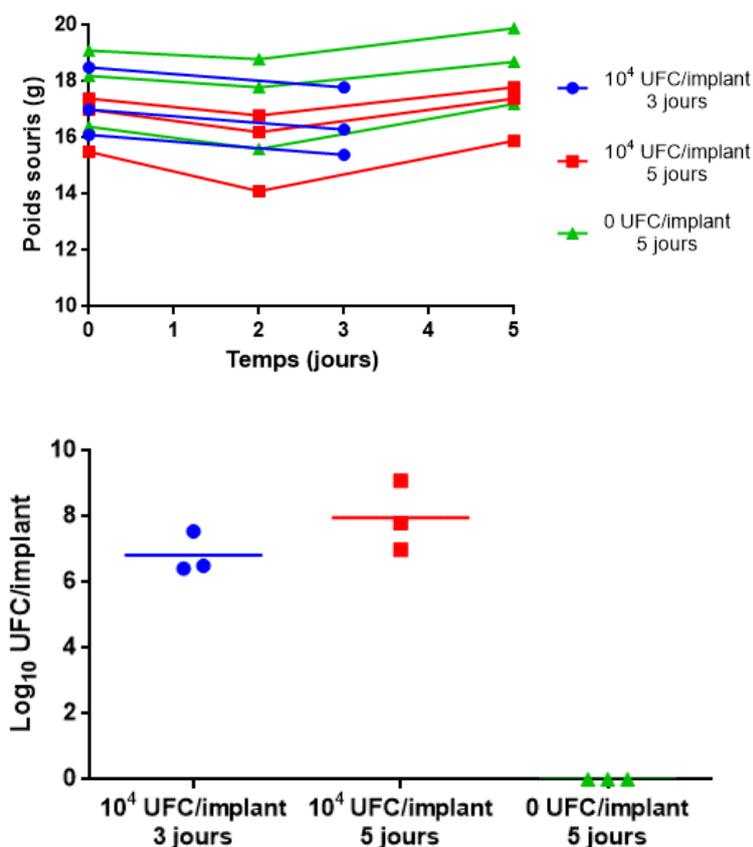


Figure 63. Poids des souris (en haut) et charge bactérienne dénombrée sur les implants après mise à mort (en bas) de souris infectées ou non par 10^4 UFC/implant durant 3 ou 5 jours

Les souris n'ont montré aucun signe de souffrance et leur poids est resté relativement stable au cours de l'infection et jusqu'à leur mise à mort (Figure 63). Aucune bactérie n'a été dénombrée parmi les implants appartenant aux souris du groupe contrôle. La courbe de poids est similaire pour les trois groupes, y compris le groupe non infecté, ce qui tend à prouver que l'absence de prise de poids dans les 2-3 premiers jours de l'expérience est causée par

l'opération de chirurgie et non par l'infection. Après 3 jours d'infection avec 10^4 UFC initialement introduites dans les implants, $10^{6.82}$ UFC ont été retrouvées adhérentes aux implants. Après 5 jours, il y en avait $10^{7.81}$, démontrant le développement de l'infection au cours du temps. Avec une charge bactérienne suffisamment élevée et un écart-type relativement faible, la durée d'infection égale à 3 jours a été retenue pour les tests suivants.

Une seconde expérience a été réalisée en faisant varier la charge bactérienne initialement introduite dans les cathéters pour une durée d'infection fixe égale à 3 jours. Pour cela, 3 groupes de 3 souris ont été traités et analysés pour leur poids, leurs signes cliniques et leur charge bactérienne adhérente à l'implant :

- Le premier groupe (contrôle) a reçu 0 UFC/implant (PBS),
- Le second groupe a reçu 10^4 UFC/implant,
- Le troisième groupe a reçu 10^6 UFC/implant.

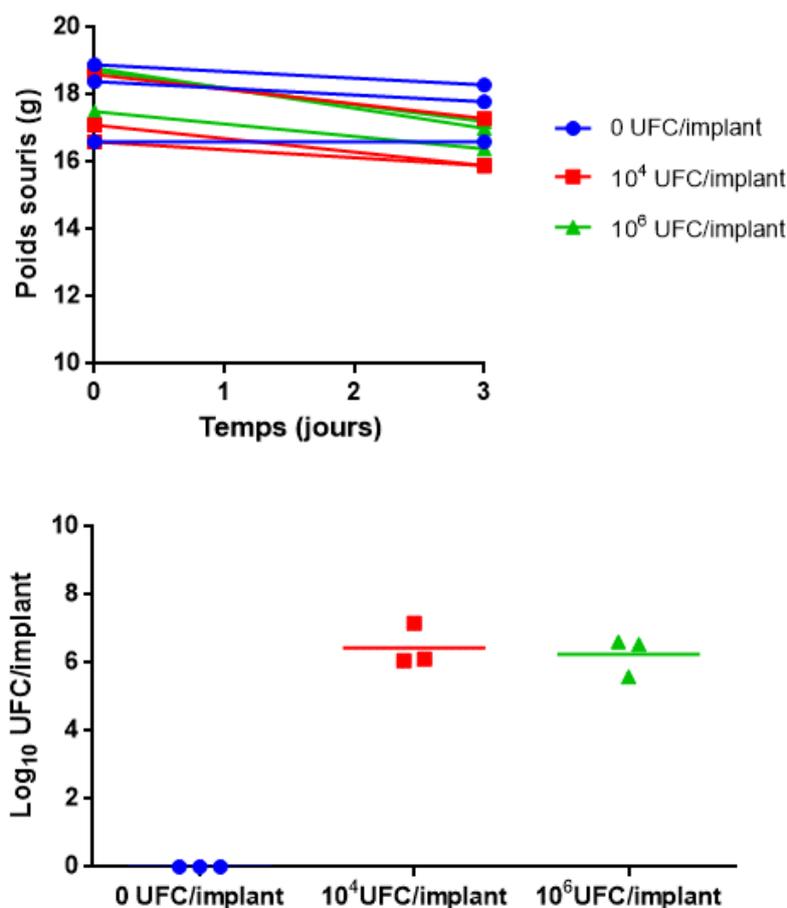


Figure 64. Poids des souris (en haut) et charge bactérienne dénombrée sur les implants après mise à mort (en bas) de souris infectées par 0, 10^4 et 10^6 UFC/implant durant 3 jours

Comme précédemment, les souris n'ont montré aucun signe de souffrance durant la période d'infection et leur poids n'a que peu diminué. Pour les souris du groupe contrôle ayant reçu du PBS au lieu de l'inoculum bactérien, aucune bactérie n'a été dénombrée sur les cathéters après 3 jours. Cette fois encore, l'absence de prise de poids ou la légère perte de poids est donc causée par la chirurgie et non par l'infection en elle-même. Pour les souris ayant reçu 10^4 ou 10^6 UFC, environ $10^{6.4}$ UFC ont été dénombrées sur les implants après 3 jours d'infection. D'une part, le nombre de bactéries initialement introduites ne semble pas être un facteur prédominant dans ce modèle d'infection, la charge bactérienne après 3 jours d'infection atteignant des valeurs similaires pour 10^4 et 10^6 UFC initialement introduites. D'autre part, ce modèle d'infection semble reproductible puisque $10^{6.44}$ et $10^{6.82}$ UFC ont été dénombrées entre les 2 expériences pour la même condition (10^4 UFC/implant et 3 jours d'infection). Enfin, l'écart-type obtenu entre souris est toujours relativement faible. Pour les procédures suivantes, le modèle d'infection reposera donc sur une injection de 10^4 UFC/implant pour 3 jours d'infection. Pour augmenter la puissance statistique des tests, les futures expériences seront réalisées avec 6 souris par groupe.

La seconde procédure permettra d'identifier la dose de rifampicine et la durée de traitement menant à une efficacité partielle dans l'éradication des biofilms (Figure 65). Comme les valeurs diffèrent d'un modèle à l'autre dans la littérature^{234,297-301,303}, 3 doses d'antibiotique et un contrôle (0, 10, 20 et 30 mg/kg) ainsi que 2 durées de traitement (2 ou 4 jours) seront testées.

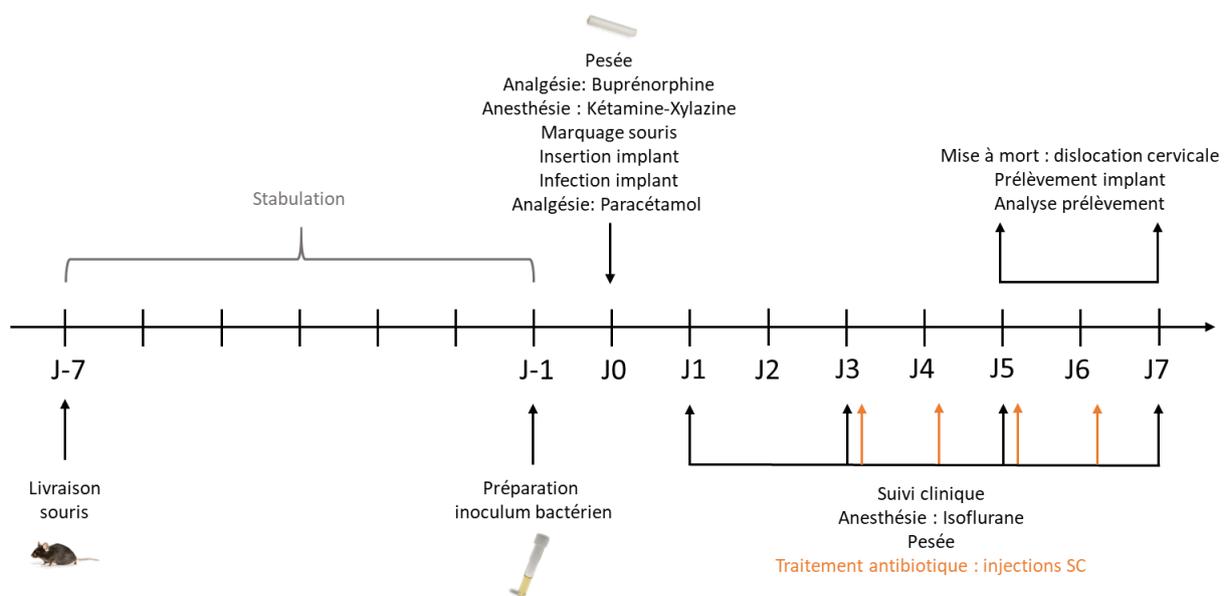


Figure 65. Chronogramme de la seconde procédure expérimentale

Dans une troisième procédure, les différentes formulations et combinaisons développées dans ce travail de thèse seront évaluées par rapport au traitement de référence mis en place dans la procédure précédente (Figure 66). Précisément, les conditions suivantes doivent être testées : la rifampicine libre et formulée dans des NP présentant ou non la PLL en surface, la DNase à plusieurs concentrations, les différentes combinaisons entre ces conditions, ainsi que la formulation de NP-RIF-DNase développée dans la première partie de cette thèse. Les contrôles appropriés (souris non infectées, non traitées et traitées avec des NP blanches présentant ou non la PLL en surface) seront également testés. La toxicité des traitements sera documentée en parallèle de leur efficacité, notamment grâce au suivi clinique des animaux ainsi qu'à une évaluation locale de la zone administrée post-mortem.

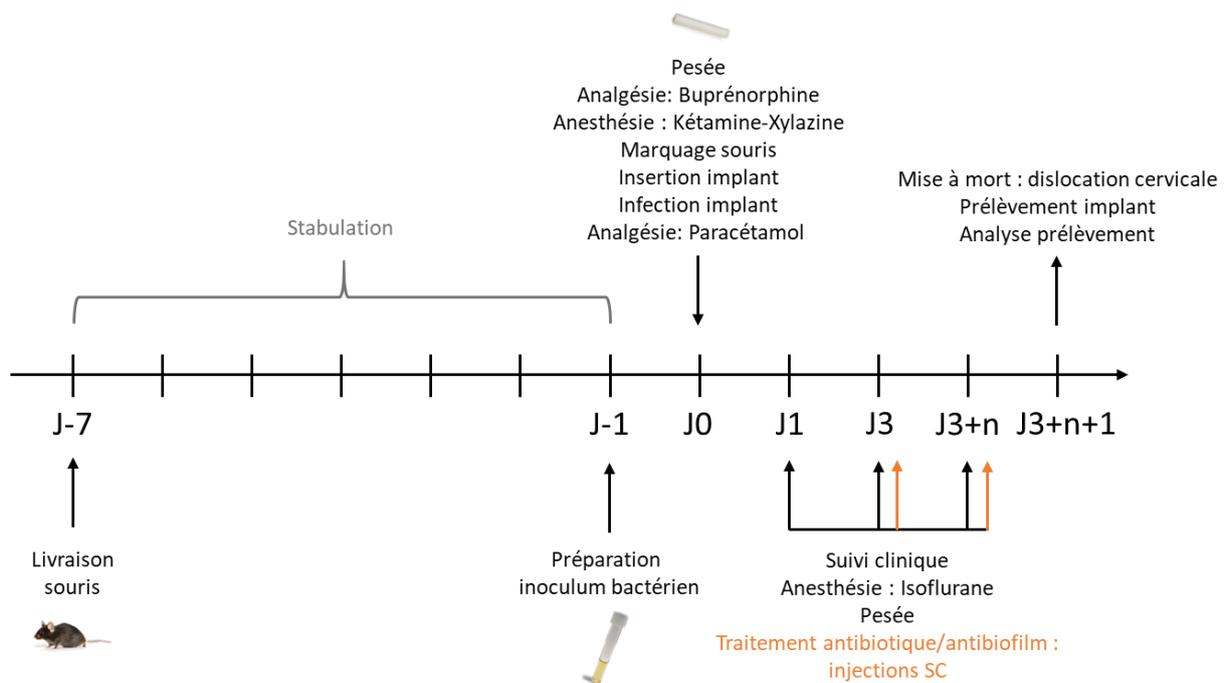


Figure 66. Chronogramme de la troisième procédure expérimentale
n est fonction de la durée de traitement déterminée dans la seconde procédure

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. DEVELOPPEMENT D'I-PARTICLES® ADAPTEES AU CHARGEMENT D'ANTIBIOTIQUES
2. UTILISATION D'I-PARTICLES® DANS LE TRAITEMENT DES BIOFILMS : UN OUTIL A FORT POTENTIEL
3. COMBINAISON ENTRE ANTIBIOTIQUE ET AGENT ANTI-BIOFILM : UNE STRATEGIE EFFICACE

Ces travaux de thèse ont été l'objet d'une collaboration étroite entre une startup en biotechnologies, Adjuvatis, et un laboratoire de recherche académique, l'équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » de l'UMR CNRS 5305 (LBTI) à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines. Face à l'efficacité clinique limitée des antibiothérapies conventionnelles dans l'éradication de biofilms bactériens, de nouvelles thérapies doivent être élaborées pour contourner les mécanismes multifactoriels de récalcitrance bactérienne. Les nanoparticules comme système de délivrance d'antibiotiques ainsi que l'utilisation d'agents anti-biofilms peuvent répondre à ces besoins en potentialisant l'action des antibiotiques et en fragilisant les biofilms. L'objectif principal de ces travaux a été de développer et d'évaluer une thérapie combinatoire à base d'i-Particles® pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms.

1. DEVELOPPEMENT D'I-PARTICLES® ADAPTEES AU CHARGEMENT D'ANTIBIOTIQUES

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de développer une formulation antibiotique à base d'i-Particles®. Les formulations devaient valider plusieurs critères pour être adaptées à la lutte contre les biofilms bactériens : un diamètre autour de 100-200 nm pour faciliter la migration dans le biofilm^{195,213,220}, des formulations homogènes en taille et stables, des concentrations élevées d'antibiotique formulé et une libération rapide de l'antibiotique pour atteindre rapidement des doses efficaces¹. Par ailleurs, l'influence d'autres paramètres physico-chimiques sur l'efficacité des traitements anti-biofilms étaient peu décrits dans la littérature, comme l'influence de la charge de surface des particules. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à développer des particules négativement et positivement chargées par adsorption d'une molécule cationique à la surface des particules formulées.

Alors que la plupart des antibiotiques disponibles sur le marché sont hydrophiles, trois antibiotiques ont été sélectionnés pour leur caractère hydrophobe, adapté à l'encapsulation dans des i-Particles® selon le procédé de nanoprécipitation : la clarithromycine (macrolide), la levofloxacin (fluoroquinolone) et la rifampicine (rifamycine)³⁰⁴. Les conditions de synthèse ont été adaptées à ces molécules car la présence de charges positives dans leur structure compromet la stabilité colloïdale assurée par des répulsions électrostatiques entre les charges négatives du PLA présentes à la surface des particules²⁶⁹. Pour cela, le pH de la phase aqueuse lors de la nanoprécipitation a été fixé à des valeurs supérieures aux pKa des amines des antibiotiques. Seulement des molécules très fortement cationiques comme la PLL peuvent s'adsorber à la surface des NP et inverser suffisamment leur charge de surface vers des valeurs supérieures à +30 mV, seuil de stabilité électrostatique entre NP²⁶⁹.

L'efficacité de chargement dans les NP est directement influencée par la solubilité aqueuse des molécules. Barichello *et al.* ont précédemment observé cet effet à l'aide de NP de PLGA et des molécules possédant des solubilités diverses dans l'eau²⁶³. En variant le pH de la phase aqueuse par la concentration de bicarbonate, la solubilité de la rifampicine est réduite, permettant d'atteindre une efficacité de chargement supérieure à 90% tout en assurant la stabilité électrostatique de la suspension de NP (pH restant supérieur au pKa de son amine). En revanche, en variant le pH, la solubilité de la levofloxacine dans la phase aqueuse demeure toujours importante, ne permettant pas d'augmenter son efficacité de chargement.

La formulation dans des i-Particles[®] d'antibiotiques et autres petites molécules ayant des groupements cationiques repose donc sur un fin paramétrage du pH permettant :

- La neutralisation des charges positives de la molécule ($\text{pH} \geq \text{pKa}$ de sa base la plus forte), assurant la stabilité électrostatique de la suspension de NP,
- La diminution de la solubilité de la molécule (fonction du pH), augmentant son chargement dans les NP.

En ayant une connaissance de ces deux paramètres pour une molécule présentant des groupements cationiques (le pKa de ses bases et sa solubilité en fonction du pH), il serait possible de prédire sa capacité de chargement dans les i-Particles[®].

Afin de mieux caractériser l'encapsulation de ces molécules dans les i-Particles[®], la simulation *in silico* par dynamique des particules dissipatives à l'aide du logiciel Material Studio est un outil adapté pour prédire le chargement de molécules dans des NP²⁸². La simulation du chargement de la rifampicine dans des i-Particles[®] a permis de préciser la conformation de la molécule dans les NP, en tenant compte de ses paramètres d'affinité pour les NP et pour la phase aqueuse. La RIF se logerait ainsi principalement à l'interface entre les NP et la phase aqueuse, *via* des interactions hydrophobes avec les NP tout en exposant ses groupements ionisés, deux phénols chargés négativement, vers la phase aqueuse. Son chargement peut atteindre des taux jusqu'à 2,5% sans entraîner l'agrégation des NP. Cette méthode a été utilisée pour simuler les interactions entre des NP et d'autres biomolécules. Le Pam₃CSK₄ est une molécule amphiphile qui suit une répartition similaire à la RIF avec l'enchevêtrement de son corps hydrophobe dans les NP et l'exposition de ses groupements hydrophiles à la phase aqueuse (Tableau 14). Elle présente également un taux de chargement limité sans déstabiliser la suspension colloïdale²⁸². En revanche, la vitamine E est une molécule très hydrophobe qui est entièrement piégée dans la matrice polymérique, permettant d'obtenir des formulations stables à des taux de chargement bien plus importants, de l'ordre de 10% (publication pour laquelle je suis co-auteur et présentée dans les **annexes**)^{305,306}.

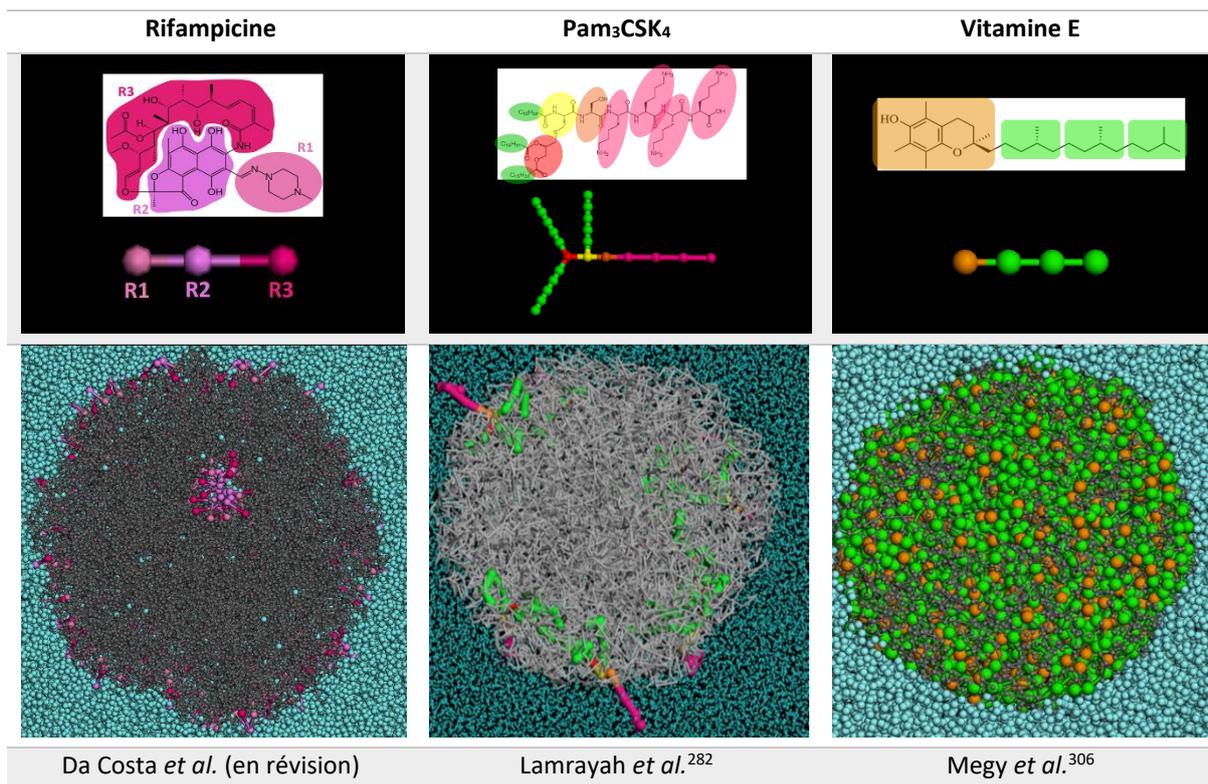


Tableau 14. Comparaison des coupes transversales obtenues par dynamique des particules dissipatives pour la simulation des interactions entre NP et diverses biomolécules découpées en billes selon leurs paramètres d'interaction

Des techniques complémentaires pourraient être envisagées pour caractériser les interactions entre NP et antibiotiques. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet par exemple de déterminer la présence de molécules encapsulées dans des NP et de suggérer si des groupements fonctionnels de la molécule et des NP ont été altérés au cours du procédé d'encapsulation³⁰⁷. Egalement, la microscopie à force atomique est une technique de microscopie permettant de visualiser la topographie de la surface de NP à l'échelle sub-nanométrique, qui pourrait éventuellement révéler la présence d'antibiotiques en surface des NP et évaluer l'homogénéité de surface recouverte ou non de PLL³⁰⁸.

Notre procédé de synthèse a permis d'atteindre des efficacités de chargement élevées (> 90%) pour des taux corrects (2%) en comparaison des autres études ayant porté sur la formulation de NP-RIF³⁰⁹⁻³¹⁶. Parmi elles, Maghrebi *et al.* ont chargé de la RIF dans des NP de PLGA par une méthode de nanopréciipitation, atteignant 24% d'efficacité de chargement seulement pour 1,2% de taux de chargement³⁰⁹. Ils ont ensuite optimisé ce chargement en développant une formulation de RIF dans des microparticules hybrides lipide/PLGA, l'utilisation de lipides permettant d'augmenter la solubilité de la RIF dans la phase organique hydrophobe. L'efficacité de chargement a atteint 47% pour 3,2% de taux de chargement³⁰⁹. Dans une autre étude, Lee *et al.* ont atteint 60% de chargement de RIF dans des microparticules de PLGA synthétisées par une méthode d'émulsion-diffusion, mais pour un

taux de 0,5% seulement³¹⁰. En 2018, Rani *et al.* sont parvenus à formuler la RIF dans des NP de PLGA à hauteur de 76% pour un taux de chargement très important de 26%, à l'aide d'une technique de nanopréciipitation³¹⁵. Pour obtenir des formulations stables avec un taux si élevé, un agent stabilisant a été ajouté dans la phase aqueuse lors de la nanopréciipitation, l'HPMA pour N-2-hydroxypropylmethacrylamide. Cette molécule, conjuguée à des principes actifs, est évaluée en phases cliniques précoces depuis la fin des années 1990 mais n'est pas passée à l'utilisation clinique de routine³¹⁷. De plus, la stratégie d'Adjuvatis est de minimiser le nombre de composants pour ses formulations pour limiter la toxicité éventuelle et simplifier les procédés de production et caractérisation. Cette stratégie constitue néanmoins une perspective intéressante pour augmenter fortement les taux de chargement. D'autres formulations comme celles de Maghrebi *et al.* nécessitent également de lyophiliser les suspensions de NP obtenues afin de les conserver³⁰⁹. Cette étape supplémentaire n'est également pas requise dans la synthèse développée chez Adjuvatis, pour lesquelles les NP-RIF sont stables plusieurs mois en solution à 4°C (pour un taux de chargement inférieur à 2,5%).

Grâce à son chargement à l'interface NP/phase aqueuse, la RIF suit une cinétique de libération depuis les NP en 2 temps avec un burst initial assez important suivi d'une libération plus lente et progressive. Ce comportement est adapté à la problématique de biofilms afin d'atteindre rapidement de fortes concentrations antibiotiques et d'éviter l'apparition des phénomènes de récalcitrance¹.

2. UTILISATION D'I-PARTICLES® DANS LE TRAITEMENT DES BIOFILMS : UN OUTIL A FORT POTENTIEL

Le second objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer l'apport de la formulation développée pour la rifampicine dans le traitement des biofilms de *S. aureus*, modèle d'étude dans le cadre de ce projet. De nombreux défis doivent être relevés pour développer un traitement efficace contre les biofilms à base de particules, tels que :

- La délivrance contrôlée d'antibiotiques,
- L'amélioration du design des particules pour augmenter leur pénétration et leur rétention dans les biofilms,
- Le ciblage efficace des cellules bactériennes dans le biofilm³¹⁸.

Les activités anti-planctonique et anti-biofilm ont été déterminées *in vitro*. Dotée d'une CMI et d'une CMB très faibles, la RIF possède cependant une activité bactéricide limitée lorsque *S. aureus* est sous forme de biofilm préformé âgé de 24h (souche SH1000) avec environ 10% de mortalité à 2 µg/mL, mesurée par marquage *live/dead*. A titre de

comparaison, Tetz *et al.* ont évalué par dénombrement bactérien, une mortalité d'environ 25% des bactéries avec 2,5 µg/mL de rifampicine dans un biofilm de *S. aureus* âgé de 24h (souche ATCC29213)¹⁵⁶. Malgré la capacité de la RIF à pénétrer dans des biofilms staphylococciques, elle n'est pas capable de les éradiquer entièrement^{102,103,319}.

A travers cette capacité de migration ainsi que sa diffusion totale depuis les i-Particles® en 24h, la RIF n'a pas été plus efficace formulée par rapport à l'antibiotique seul dans l'éradication des biofilms de *S. aureus in vitro*. Ce résultat a été observé dans d'autres études comme celle de Fazly Bazzaz *et al.* qui ont développé des nanoparticules de type solide lipide chargées en RIF³¹⁶. Malgré un vecteur possédant des propriétés anti-biofilms intrinsèques, la formulation de la RIF ne permettait pas de potentialiser son activité bactéricide contre des biofilms de *S. epidermidis*. C'est également le cas pour d'autres antibiotiques comme on peut le constater dans l'étude de Thomas *et al.* qui ont évalué *in vitro* des nano et microparticules de PLGA dans le traitement de biofilms de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* à la ciprofloxacine, sans démontrer de potentialisation de l'activité antibiotique par l'utilisation de ces particules polymériques²⁵².

Nous avons en revanche caractérisé la migration des i-Particles® dans des biofilms et leur capacité à interagir *via* des liaisons électrostatiques avec la matrice et les bactéries. L'adsorption de la PLL en surface des NP entraîne l'inversion de leur charge vers des valeurs hautement positives permettant de renforcer les interactions des NP avec les bactéries possédant une surface globalement négative, et probablement avec les composants anioniques de la matrice des biofilms, comme l'ADNe¹⁹⁵. Ces interactions permettent de retenir les NP chargées positivement dans les biofilms et de délivrer progressivement l'antibiotique à des concentrations efficaces, avantage prépondérant dans l'amélioration des traitements anti-biofilms²³⁰. C'est à notre connaissance la première fois qu'une corrélation est faite entre la capacité des NP à être retenues dans un biofilm et leur efficacité thérapeutique. Une expérience similaire a été réalisée avec une autre formulation sur bactéries planctoniques seulement. Des NP cationiques de PLGA chargées en clindamycine et coatées par de la polyéthylèneimine ont exercé une activité bactéricide de 3 log sur *S. aureus* planctoniques par rapport aux particules anioniques ou à l'antibiotique seul après 1h d'incubation suivie de lavages²³⁸. Elles n'ont cependant pas inhibé totalement la croissance bactérienne (viabilité bactérienne à 10⁵ UFC/mL) contrairement à nos NP-RIF cationiques.

Une combinaison des deux outils développés pourrait être envisagée dans le traitement des infections à biofilms. D'une part, les i-Particles® non coatées sont capables de pénétrer dans les zones les plus profondes d'un biofilm et de manière homogène, assurant un effet direct de l'antibiotique libéré. D'autre part, les i-Particles® coatées par de la PLL sont capables d'être retenues plus fortement dans les biofilms par interaction électrostatique,

permettant un effet de l'antibiotique libéré à plus long terme. Cependant, la toxicité et la rapide clairance des NP cationiques représente une limite au développement d'une telle stratégie pour éradiquer les biofilms bactériens dans un organisme^{220,239,240}. De plus, ces charges cationiques favorisent les interactions avec les cellules et macromolécules de l'hôte, ce qui peut limiter la capacité de telles particules à atteindre le biofilm. Des stratégies innovantes ont été développées dans la littérature pour contourner ce problème. Radovic-Moreno *et al.* ont développé des NP de PLGA recouvertes de PEG et de PLH, la poly-L-histidine, polymère cationique similaire à la PLL à l'exception que son amine protonable se situe dans un noyau imidazole, lui conférant un pKa proche de 6-6,5 contre 10,2 pour la PLL (Figure 67)⁵¹. A pH physiologique, les NP sont chargées négativement et sont donc plutôt furtives. A pH acide comme celui des biofilms bactériens (proche de 5), la PLH se protone et les NP deviennent chargées positivement, permettant leur interaction et leur rétention dans les biofilms.

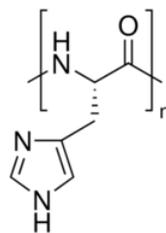


Figure 67. Structure chimique de la poly-L-histidine (PLH)

Les i-Particles® constituent un outil intéressant pour potentialiser l'action des antibiotiques dans le traitement des biofilms bactériens. Elles peuvent être customisées à façon avec un autre antibiotique ou molécule, et en fonction de la pathologie ciblée, extensible notamment à tout autre type de biofilm bactérien. Par exemple, les procédures endodontiques régénératives à base d'hydrogels contenant des cellules souches représentent un intérêt pour la reconstruction de la pulpe dentaire dans l'espace endodontique de dents humaines dévitalisées. Seulement, la présence de bactéries sous forme de biofilms limite le processus de régénération. L'utilisation de clindamycine chargée dans des i-Particles® dispersées dans un hydrogel de fibrine a fait l'objet d'une publication³²⁰ pour laquelle je suis co-auteur et qui se trouve dans les **annexes**. Antibiotique sélectionné pour ses propriétés antibactériennes reconnues cliniquement dans le traitement des infections endodontiques³²¹, le pKa de l'amine présente dans sa structure est de 7,8. Son chargement dans des i-Particles® a donc été réalisée dans une phase aqueuse de bicarbonate à 5 mM (pH 8,5), similairement aux antibiotiques utilisés au cours de ces travaux de thèse, afin d'obtenir des suspensions stables. Modérément soluble dans l'eau, son efficacité de chargement a atteint 43% pour un

taux de chargement de 1%. Ses propriétés anti-planctoniques et anti-biofilms étaient similaires à l'antibiotique seul *in vitro*. En revanche, l'antibiotique chargé dans les NP diffusait de manière plus lente depuis l'hydrogel, permettant une délivrance progressive de l'antibiotique dans l'espace endodontique. Aussi, ce matériau ne présentait pas de toxicité contre les cellules souches et n'endommageait pas non plus leur fonctionnalité, synthétisant normalement du collagène de type I. Cet hydrogel nanocomposite antibactérien pourrait donc être un outil intéressant pour la régénération de la pulpe dentaire dans un environnement maintenu aseptique sur des périodes de temps prolongées.

3. COMBINAISON ENTRE ANTIBIOTIQUE ET AGENT ANTI-BIOFILM : UNE STRATEGIE EFFICACE

Le troisième objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer l'apport de la combinaison d'un agent anti-biofilm et plus particulièrement de la DNase avec la thérapie antibiotique développée à base d'i-Particles® pour lutter contre des biofilms de *S. aureus*. La DNase a été sélectionnée parmi la vaste gamme d'agents anti-biofilms car, dans l'idée d'un développement clinique de la thérapie combinatoire évaluée dans ce projet, elle présente l'avantage d'être déjà présente sur le marché des traitements thérapeutiques, ayant validé les aspects réglementaires pour une application donnée. En effet, la Dornase alfa (Pulmozyme®) est une DNase recombinante humaine approuvée par la FDA en 1993 pour le traitement de la mucoviscidose. Administrée par voie pulmonaire, elle dégrade l'ADN extracellulaire présent en forte concentration dans le mucus des patients, permettant de le fluidifier pour faciliter son expectoration¹⁹².

La DNase a également été choisie pour ses propriétés anti-biofilms intéressantes et reconnues, en considérant les multiples rôles de l'ADNe tout au long du cycle de vie d'un biofilm. Bien qu'elle ne présente pas la capacité d'inhiber la croissance ou tuer les bactéries, il est reporté dans la littérature que la DNase est capable d'inhiber l'adhésion des bactéries à une surface, première phase de formation d'un biofilm impliquant l'ADNe²⁷. Cependant, l'utilisation du Biofilm Ring Test® n'a pas permis de révéler cette activité dans notre étude. Il est possible que la capacité d'adhésion des bactéries médiée par l'ADNe soit souche-dépendante. Moormeier *et al.* ont notamment démontré que la DNase I n'a aucun effet sur l'adhésion d'un biofilm de *S. aureus* (souche UAMS-1) durant les 8 premières heures de croissance³²².

Le rôle de l'ADNe dans des biofilms de *S. aureus* est également important dans les étapes plus tardives de leur formation³²³. En dégradant l'ADN sécrété par les bactéries dans

la matrice, nous avons montré que l'enzyme est capable de réduire la biomasse d'un biofilm de manière dose-dépendante, et en fonction de l'état de maturation de ce dernier. Sa combinaison avec la rifampicine, capable d'inhiber la croissance du biofilm, permet alors de potentialiser l'action de la DNase sur un biofilm préformé. De plus faibles doses d'enzyme sont nécessaires pour atteindre une efficacité similaire à lorsqu'elle est utilisée seule. Cependant, la capacité de la DNase à fragiliser le biofilm n'a pas permis d'augmenter l'activité bactéricide de la rifampicine utilisée en combinaison. Cet effet a pourtant été observé dans la littérature, comme le démontre l'étude de Tetz *et al.* avec l'augmentation de la mortalité bactérienne de biofilms de souches diverses (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*...) lorsque des antibiotiques comme la rifampicine, la levofloxacin ou l'azythromycine sont combinés avec de la DNase¹⁵⁶. En tenant compte des limites précédemment décrites des modèles d'étude statique *in vitro*, l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de cette thérapie combinatoire pourrait mettre en avant un effet de sensibilisation de l'activité bactéricide de l'antibiotique.

La combinaison thérapeutique entre les NP-RIF, les NP-RIF-PLL et la DNase pourrait constituer un traitement performant dans la lutte contre les biofilms bactériens. En axe d'amélioration de cette thérapie, la DNase pourrait être fonctionnalisée à la surface des NP-RIF, permettant de la protéger éventuellement des dégradations par les protéases et d'atteindre plus efficacement les bactéries les plus inaccessibles d'un biofilm. Une formulation de NP-RIF-DNase a notamment été développée au cours de ces travaux de thèse mais n'a pas été évaluée *in vitro*. Baelo *et al.* ont développé une formulation de NP de PLGA chargées en ciprofloxacine et fonctionnalisées par de la DNase en surface²²⁶. De la PLL a été nécessaire comme intermédiaire entre les NP et la DNase ainsi que deux agents de couplage, l'ethyl(diméthylaminopropyl)-carbodiimide et le N-hydroxysuccinimide, permettant une liaison covalente entre la PLL et la DNase. Alors que les formulations à base de DNase ont un léger effet toxique sur des macrophages de souris *in vitro*, la présence de l'enzyme à la surface des NP chargées en antibiotique a permis de diminuer significativement la charge bactérienne de biofilms de *P. aeruginosa*, jusqu'à des valeurs quasiment nulles par rapport à la combinaison entre l'antibiotique et la DNase non formulés ou entre l'antibiotique formulé dans des NP et la DNase formulée sur des NP séparément. Ainsi, la potentialisation de l'activité d'un antibiotique par son chargement dans des NP en combinaison avec la DNase sur leur surface constitue une stratégie prometteuse pour contourner les phénomènes de récalcitrance bactérienne et éradiquer les biofilms.

CONCLUSION

Le développement de traitements alternatifs aux soins médicaux antibiotiques standards est indispensable pour lutter efficacement contre les infections à biofilms bactériens. Les systèmes de délivrance de principes actifs à base de particules ont un grand potentiel pour le développement de futures thérapies, permettant d'accroître l'efficacité de molécules existantes, en augmentant leur biodisponibilité au site d'intérêt. Néanmoins, l'efficacité de ces vecteurs dépend de nombreux paramètres dont leurs propriétés physico-chimiques qui conditionnent leur capacité de migration dans les biofilms, de rétention ou de délivrance contrôlée des molécules antibiotiques. Alors que l'influence de la composition ou de la taille des vecteurs est assez bien décrite dans la littérature, l'impact de la charge de surface des particules est encore peu documenté.

Pendant cette thèse, nous avons donc développé et caractérisé des particules submicroniques comme système de délivrance d'antibiotique pour lutter contre les biofilms bactériens. La rifampicine constitue le meilleur candidat parmi les trois antibiotiques étudiés grâce à son hydrophobicité adaptée à son chargement élevé dans les nanoparticules. L'adsorption de la poly-lysine, un peptide cationique, en surface des particules a permis d'inverser leur charge vers des valeurs positives, permettant de disposer de NP-RIF chargées négativement ou positivement.

Sur un modèle *in vitro* de biofilms de *S. aureus*, la vectorisation de la rifampicine dans des i-Particles® n'a pas permis d'augmenter son activité bactéricide par rapport à l'antibiotique seul. En revanche, nous avons démontré dans cette étude que les particules sont capables d'interagir de manière électrostatique avec les biofilms et notamment les bactéries, permettant leur rétention au sein des biofilms et la délivrance progressive de l'antibiotique au plus proche de sa cible. L'inversion de la charge de surface des particules par la PLL permet de renforcer ces interactions et donc de diminuer les quantités de formulations nécessaires pour maintenir une efficacité anti-biofilm. Cette étude a donc permis de démontrer l'intérêt fondamental d'optimiser les paramètres physico-chimiques des formulations utilisées pour vectoriser un antibiotique afin de potentialiser son mode d'action. Ce concept validé, la stratégie thérapeutique développée au cours de ces travaux de thèse pourrait être améliorée à l'avenir dans le cas d'une toxicité avérée *in vivo* des particules chargées positivement, notamment par un système d'inversion de la charge de surface pH-dépendante, adapté aux biofilms relativement acides.

Le recours à des systèmes de délivrance de principes actifs facilite également une autre stratégie de lutte contre les biofilms : la combinaison d'antibiotiques et d'agents anti-biofilms, qui peuvent alors avoir une action synergique. Nous avons ainsi évalué la combinaison de ces particules chargées en antibiotique avec un agent anti-biofilm, la DNase, pour améliorer l'éradication des biofilms de *S. aureus*. Capable de fragiliser la matrice des biofilms et d'induire

leur détachement, d'autant plus lorsqu'elle est combinée à la rifampicine, la DNase n'a cependant pas permis de sensibiliser l'action de l'antibiotique dans l'éradication des bactéries *in vitro*. Cette stratégie thérapeutique combinatoire à base d'i-Particles® pourrait cependant donner des résultats intéressants *in vivo* chez la souris, en tenant compte des phénomènes complexes qui régissent le devenir d'un principe actif administré dans un organisme vivant. Enfin, la combinaison avec la DNase en la fonctionnalisant en surface des i-Particles® contenant l'antibiotique pourrait également potentialiser son efficacité anti-biofilm.

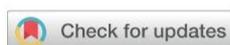
La question du mode d'administration de ces particules peut enfin se poser. Pour une application dentaire, des i-Particles® chargées en clindamycine ont été incorporées dans un hydrogel injectable pour favoriser la régénération de la pulpe dentaire. Celle-ci est freinée par les infections endodontiques récurrentes, et une asepsie sur le long terme, sans induire de toxicité envers les cellules souches sensibles est requise. Les particules, adaptées à une formulation dans un tel hydrogel, ont permis une libération contrôlée de l'antibiotique hors de l'hydrogel.

Pour conclure, la thérapie combinatoire à base d'agent anti-biofilm et de particules biodégradables pour la délivrance d'antibiotiques présente un fort potentiel pour lutter contre les biofilms bactériens. A la suite de ce travail, l'évaluation *in vivo* de l'efficacité et de la toxicité de cette thérapie doit être envisagée. Les formulations développées pourraient être optimisées à terme, pour envisager le développement clinique de cette thérapie anti-biofilm.

ANNEXES

1. ARTICLE : DEVELOPMENT OF AN ANTIBACTERIAL
NANOCOMPOSITE HYDROGEL FOR HUMAN DENTAL
PULP ENGINEERING

2. ARTICLE : MOLECULAR DYNAMICS STUDIES OF
POLY(LACTIC ACID) NANOPARTICLES AND THEIR
INTERACTIONS WITH VITAMIN E AND TLR AGONISTS
PAM₁CSK₄ AND PAM₃CSK₄



Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering†

Cite this: DOI: 10.1039/d0tb00989j

M. Bekhouche,^{id} *^{ab} M. Bolon,^{id} ^a F. Charriaud,^{id} ^a M. Lamrayah,^a
D. Da Costa,^{id} ^{ac} C. Primard,^{id} ^c A. Costantini,^a M. Padeloup,^{id} ^a S. Gobert,^{id} ^a
F. Mallein-Gerin,^{id} ^a B. Verrier,^{id} ^a M. Ducret,^{id} ^{abd} and J.-C. Farges,^{id} ^{abd}

Hydrogel-based regenerative endodontic procedures (REPs) are considered to be very promising therapeutic strategies to reconstruct the dental pulp (DP) tissue in devitalized human teeth. However, the success of the regeneration process is limited by residual bacteria that may persist in the endodontic space after the disinfection step and contaminate the biomaterial. The aim of this work was to develop an innovative fibrin hydrogel incorporating clindamycin (CLIN)-loaded Poly (D,L) Lactic Acid (PLA) nanoparticles (NPs) to provide the hydrogel with antibacterial properties. CLIN-PLA-NPs were synthesized by a surfactant-free nanoprecipitation method and their microphysical properties were assessed by dynamic light scattering, electrophoretic mobility and scanning electron microscopy. Their antimicrobial efficacy was evaluated on *Enterococcus faecalis* by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal biofilm inhibition and eradication concentrations (MBIC and MBEC). Antibacterial properties of the nanocomposite hydrogel were verified by agar diffusion assays. NP distribution into the hydrogel and release from it were evaluated using fluorescent PLA-NPs. NP cytotoxicity was assessed on DP mesenchymal stem cells (DP-MSCs) incorporated into the hydrogel. Type I collagen synthesis was investigated after 7 days of culture by immunohistochemistry. We found that CLIN-PLA-NPs displayed a drug loading of $10 \pm 2 \mu\text{g}$ per mg of PLA polymer and an entrapment efficiency of $43 \pm 7\%$. Antibiotic loading did not affect NP size, polydispersity index and zeta potential. The MIC for *Enterococcus faecalis* was $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. MBIC₅₀ and MBEC₅₀ were 4 and $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. CLIN-PLA-NPs appeared homogeneously distributed throughout the hydrogel. CLIN-PLA-NP-loaded hydrogels clearly inhibited *E. faecalis* growth. DP-MSC viability and type I collagen synthesis within the fibrin hydrogel were not affected by CLIN-PLA-NPs. In conclusion, CLIN-PLA-NP incorporation into the fibrin hydrogel gave the latter antibacterial and antibiofilm properties without affecting cell viability and function. This formulation could help establish an aseptic environment supporting DP reconstruction and, accordingly, might be a valuable tool for REPs.

Received 16th April 2020,
Accepted 24th July 2020

DOI: 10.1039/d0tb00989j

rsc.li/materials-b

1. Introduction

Regenerative endodontic procedures (REPs) aim at reconstructing a dental pulp (DP) tissue in the endodontic space of devitalized human teeth, in order to restore major functionalities involved in injury detection such as immune surveillance and sensitivity.^{1–5} Over the last decade, many tissue engineering approaches have

been developed to achieve this goal. Most are based on the injection, into the cleaned endodontic space, of a three-dimensional (3D) scaffold incorporating or not DP mesenchymal stem cells (DP-MSCs).⁴ Numerous kinds of scaffolds were tested, such as natural and synthetic polymers/co-polymers, hydroxyapatite/tricalcium phosphate powders, self-assembling peptide systems, platelet-rich plasma and decellularized extracellular matrices (ECM).^{6–11} However, all of them only partially reach the materiobiological criteria necessary for DP regeneration which include bioinspired structural design, low cytotoxicity, physiological degradation by host and/or incorporated cells, and rapid replacement with an ECM characteristic of the tissue.^{8,11,12} In addition, authors rarely took into consideration one major limit of REPs which is the persistence of residual bacteria in the endodontic space after the disinfection step. Indeed, bacteria are hardly eliminated by the disinfectants classically used such as

^a Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR5305 CNRS/ Université Lyon 1, Lyon, France

^b Faculté d'Odontologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

^c Adjuvatis[®], Lyon, France

^d Hospices Civils de Lyon, Service de Consultations et Traitements Dentaires, Lyon, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Clindamycin detection by HPLC and stability (SI1) – calibration curve of PLA-fluoNPs and fluorescence release (SI2). See DOI: 10.1039/d0tb00989j



sodium hypochlorite, owing to their organization into biofilms on the dentin surface and their deep penetration within dentin tubules. They clearly hamper DP regeneration^{13–15} by promoting host immune/inflammatory events instead of regenerative ones. To overcome this difficulty, polydioxanone-based nanofibrous hydrogels containing metronidazole, ciprofloxacin, and/or clindamycin^{16–19} have been proposed. Although these scaffolds displayed effective antibacterial properties against species present into the endodontic space such as *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*, they strongly affected DP-MSCs viability (up to 50%). Therefore, designing new hydrogel formulations with antibacterial and antibiofilm properties, capable of preserving cell viability and function, is clearly required.^{8,11,20}

Fibrin was recently reported as a promising scaffold material for REPs since it promotes DP-like tissue formation both *in vitro* and *in vivo*.^{11,21} We recently developed an injectable fibrin hydrogel formulation highly suitable to dental practice since it clearly supported DP-MSCs viability and DP-like collagenous ECM deposition.²⁰ However, neither fibrin nor its degradation products display any antimicrobial activities.²² We decided in the present study to give our newly developed fibrin scaffold antibacterial properties by adding antibiotic-loaded nanoparticles (NPs).

NPs used as carriers have demonstrated high relevance in antibiotic delivery since they preserve the native structure of the drug, enhance its bioavailability and biodistribution in infected tissues and ensure its high concentration locally. By slowly releasing the molecule, they increase the exposure time of the bacterial population to the antibiotic whereas, by restraining the drug localization within the infected site, they minimize putative systemic side effects.²³ Antibiotic-loaded NPs appear well adapted to biofilm eradication owing to their ability to penetrate deep into biofilm matrices.²⁴ This penetration enables the antibiotic to reach the deepest and most persistent bacteria which are difficult to eliminate.²⁵ Over the last years, Poly (D,L) Lactic Acid NPs (PLA-NPs) received considerable attention, because of their biodegradable nature, biocompatibility, and low immunogenicity.²⁶ PLA is a biopolymer with high safety profile²⁷ which has been approved by the US Food and Drug Administration for various applications.²⁶ PLA-NPs constitute a versatile carrier of drugs and vaccines^{26–28} and have been used to deliver antifungal and antibacterial drugs such as amphotericin B,²⁹ minocycline³⁰ and pipemidic acid.³¹ Our hypothesis was that PLA-NPs could constitute a suitable antibiotic carrier that, once added to our fibrin hydrogel formulation, would provide the hydrogel with antibacterial and antibiofilm properties. The antibiotic clindamycin (CLIN) was chosen because of its broad spectrum activity against endodontic bacteria and its routine use in oral medicine in patients allergic to β -lactams.³² Also, CLIN can be easily incorporated into PLA-NPs owing to its hydrophobicity.^{33–35}

This study aimed at designing a nanocomposite scaffold made of a fibrin hydrogel supplemented with CLIN-loaded PLA-NPs in order to provide the aseptic environment necessary for DP regeneration without affecting DP-MSC viability and function (Fig. 1).

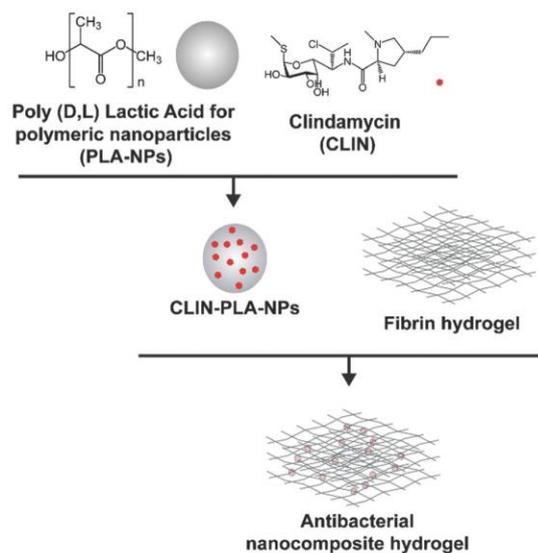


Fig. 1 Schematic representation of the two-step synthesis of the nanocomposite hydrogel.

2. Experimental

2.1 NP synthesis

PLA (MW 45 g mol⁻¹, pK_a 3.8) was produced according to the patent FR2745005A1 of Phusis (France). CLIN (MW 424.98 g mol⁻¹, pK_a 7.6, log P 2.16) was purchased from Sellekchem (USA). CLIN-PLA-NPs were synthesized as previously described using a surfactant-free solvent diffusion method.³⁶ Briefly, CLIN and PLA were dissolved in acetone (2.5% w/w) and this solution was slowly added to an aqueous phase composed of ethanol and 4 mM carbonate buffer (pH 10) under moderate stirring. Pyrogen free water (Otec, Aiguettant, France) was added at the end of pouring to favour solvents evaporation under reduced pressure and controlled temperature using a Rotavapor coupled to a heating bath (Buchi, France). The final volume of particles was precisely measured as well as the final pH of the solution (pH 8.5, storage buffer). NPs without CLIN were synthesized in parallel using the same method.

2.2 NP morphophysical properties

NP hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential were measured for the different CLIN-PLA-NP and PLA-NP batches after dilution (1/150) of the NP suspension in 1 mM NaCl using a Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern Instruments, UK). Diameter and PDI were measured by dynamic light scattering (DLS) at 25 °C at a 173 degree angle. The zeta potential was determined by measuring electrophoretic mobilities by laser Doppler velocimetry using the same device, at a scattering angle of 12.5 degree. Each value was the average of 4 measurements.

NP morphology was visualized with a scanning electron microscope equipped with a field emission gun (FEI Quanta



250 SEM, Thermo Fischer Scientific, USA). For sample preparation, the NP solution was diluted 10 times and a drop was deposited on a glass coverslip then air-dried. The coverslip was then copper sputtered (BAL-TEC, MCS 010, UK) prior to observation.

2.3 CLIN loading into PLA-NPs

The amount of CLIN incorporated into the PLA-NPs was determined using the high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Visible detection method developed by Na-Bangchang *et al.*³⁷ The HPLC system was composed of a Degasser 1260 (Agilent, USA), a Quaternary Pump G1311A, an Autosampler G1329A, a Column Heater G1316A and a Diode Array Detector G1315A, all four from Hewlett Packard (USA). Chromatograms were obtained using the Chem Station for Liquid Chromatography 3D System software (Hewlett Packard, USA). The stationary phase was a CLYPEUS C18 column (5 μm , 100×4 mm, Higgins Analytical, USA). The mobile phase was composed of 0.02 M disodium hydrogenophosphate (Sigma Aldrich, France) (pH 2.8) and acetonitrile (ACN, Carbo Elba, Italy) in proportion 76 : 24 (v/v). The solvent used was HPLC grade. The chromatographic analysis was operated at 25 $^{\circ}\text{C}$. A 100 μL volume was injected at a flow rate of 0.75 mL min^{-1} . The wavelength was set at 200 nm. This method showed linearity ($R^2 = 0.997$) in the CLIN concentration range 1–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ESI[†] 1).

The CLIN-PLA-NP suspension was centrifuged at 11 000 rpm for 45 min and the supernatant was transferred in a new tube for quantification. CLIN-PLA-NPs present in the pellet were solubilized using ACN to release loaded CLIN. PLA was precipitated by adding pure methanol (Carbo Elba, Italy) with a total solvent volume of 50 μL per g of PLA. The ratio ACN:methanol was adjusted to 1 : 14 (v/v).

Entrapment efficiency (EE) was calculated using the formula:

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Mass of encapsulated CLIN}}{\text{Total mass of CLIN}} \times 100$$

Drug loading (DL) was calculated using the formula:

$$\text{DL (\mu g mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Mass of encapsulated CLIN}}{\text{Mass of PLA polymer}}$$

To assess CLIN release from the NPs, CLIN-PLA-NPs were diluted in PBS buffer (1 : 1, v : v) and incubated in triplicate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 9 days. At different time points (5, 22, 46, 90, 162, 214 h), the NPs were collected by centrifugation at 11 000 rpm for 45 min and the CLIN content was determined as described above. The clindamycin release from the nanoparticles at each time was reported as a percentage of the starting mass of CLIN. Stability of clindamycin in PBS at 37 $^{\circ}\text{C}$ was assessed by HPLC for 21 days (ESI[†] 1).

2.4 Antibacterial and antibiofilm properties

The *E. faecalis* (ATCC[®] 47077) strain was used to evaluate the antibacterial properties of CLIN-PLA-NPs. The minimal inhibitory concentration (MIC), defined as the lowest antibiotic concentration that inhibits a visible planktonic bacterial growth after an overnight

incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, was determined using the broth microdilution method. An *E. faecalis* suspension was prepared to obtain an optical density (OD) of 0.004 at 600 nm, which corresponds to 10^6 colony forming units (CFU) per mL. The suspension was cultured in a 96-well plate in brain-heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson, USA), in the presence of serial dilutions of free CLIN (0.004 to 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or of the corresponding CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs dilutions (see Result section 3.1). The plate was incubated for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and OD was measured at 600 nm with a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). The lowest CLIN concentration that yields an OD similar to the negative control was determined as the MIC. The MIC value was confirmed by seeding the bacterial suspensions used for MIC determination on BHI-agar plates (Sigma Aldrich, France).

The minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC), defined as the lowest antibiotic concentration that inhibits the growth of a visible biofilm, was determined by culturing *E. faecalis* in BHI supplemented with 1% glucose (Sigma Aldrich), then by plating bacteria at an initial OD of 0.004 during 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, in the presence of the same CLIN, CLIN-PLA-NP or PLA-NP serial dilutions as previously described in this section. Biofilms formed after 24 h³⁸ were washed three times with PBS (Gibco, France) and stained with 0.1% crystal violet (Sigma Aldrich). After a 15 min incubation, biofilms were washed again three times with water and dried at room temperature (RT). Glacial acetic acid was added to solubilize crystal violet and biofilm absorbance was measured at OD 590 nm.

The minimal biofilm eradication concentration (MBEC), defined as the lowest antibiotic concentration that eradicates a 24 hour old biofilm³⁸ was determined in the same experimental conditions as for MBIC measurement, except that free CLIN, CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs were added on a 24 hour old *E. faecalis* biofilm.

Antimicrobial properties of the nanocomposite fibrin hydrogel (see Section 2.5 for hydrogel preparation) were assessed using an agar diffusion method based on the plating of hydrogels containing 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CLIN, CLIN-PLA-NPs or equivalent 0.2, 0.4 or 0.8% solid content PLA-NPs, on BHI broth-agar previously seeded with *E. faecalis* at 1.5 OD. Each experiment was performed three times in triplicate. After 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, inhibition areas were photographed and measured using the Fiji software.

2.5 PLA-NP distribution and release from the nanocomposite hydrogel

The fibrin hydrogel formulation was prepared as previously described by Ducret *et al.*²⁰ to obtain a final fibrin hydrogel composed of 10 mg mL^{-1} fibrinogen ($M_w \sim 340$ kDa, pI 5.8) (EMD Millipore Corp., USA) which had been polymerized in the presence of 4 U mL^{-1} thrombin (Sigma Aldrich, France). CLIN-PLA-NPs or free CLIN were added to obtain a final concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CLIN into the hydrogel.

To characterize the microstructure of the fibrin hydrogel and NP localization, fibrin-alone and CLIN-PLA-NP-loaded fibrin hydrogels were treated for scanning electron microscopy



(SEM). Briefly, samples were rinsed with water, frozen in pasty nitrogen, sublimated at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ to unveil the fibrin network and sputtered with gold/palladium. Samples were then observed with a FEI Quanta 250 SEM (Thermo Fisher Scientific, USA).

To assess CLIN release, hydrogels were prepared as above in the presence of $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin in free (CLIN) or formulated (CLIN-PLA-NPs) forms, or of the equivalent 0.2% solid content empty particles (PLA-NPs). After polymerization, 1 volume of PBS was added on the top of the hydrogel and incubated in a humidified chamber at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. At different time points (0.25, 0.5, 2, 3, 6, 24 h), the solution was collected and replaced with a fresh one. Samples were analysed by HPLC-UV and the cumulative CLIN release was determined. The assay was realized in triplicate using three different batches of nanoparticles.

General distribution of NPs in the hydrogel was assessed using PLA-NPs coupled with a green-Bodipy fluorophore (PLA- fluo -NPs) (Adjuvatis[®], France). PLA- fluo -NPs had a diameter of 171 nm, a PDI of 0.03 and a zeta potential of $-57 \pm 1\text{ mV}$, all values comparable to non-fluorescent PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs (see Result section 3.1). PLA- fluo -NPs displayed an EE of 95–98%, which indicated that the measured fluorescence intensity reflected directly the NP amount present in the hydrogel. Nanocomposite hydrogels were formulated as previously described, using the same amount of PLA- fluo -NPs as for CLIN-PLA-NPs. They were observed with an Eclipse TE300 fluorescence microscope (Nikon, Japan) using an excitation wavelength of 505 nm and an emission wavelength of 515 nm. Images were analysed using the Fiji software.

To assess NP release over time, hydrogels containing PLA- fluo -NPs were incubated in PBS at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 days. The incubation medium was collected at different time points (24, 48, 72 and 96 h) and the fluorescence intensity was determined using a multimode flagship microplate reader (Infinite M1000, Tecan, Switzerland). The percentage of released PLA- fluo -NPs was calculated by comparing the released fluorescence to the total fluorescence incorporated in the hydrogel, because fluorescence intensity is directly proportional to PLA- fluo -NPs concentration in these conditions ($R^2 > 0.99$) (ESI[†] 2).

2.6 DP-MSC isolation and expansion

Isolation and expansion of DP-MSCs were performed with a good manufacturing practice approach as described previously.^{39,40} Briefly, healthy impacted human third molars were collected from donors aged 13–17 years with informed consent of the patients and their parents, in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki and the French Public Health Code (Article R1211-49), and following a protocol approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH: DC-2014-2325). DPs from teeth between Nolla developmental stages 5 (crown almost completed) and 7 (one third root completed) were gently extirpated from pulp cavities and cut into fragments of about $0.5\text{--}2\text{ mm}^3$. Pulp fragments were seeded as explants on dishes pre-coated with a mixture of human placental collagens I and III ($0.5\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$) and cultured in Optistem[®] serum-free medium (Univercell Biosolutions, France) supplemented with 100 IU mL^{-1} penicillin

and 100 mg mL^{-1} streptomycin (Thermo Fischer Scientific, USA). After 2 weeks, cells outgrowing from the explants were harvested using TrypLE[®] (Thermo Fischer Scientific, USA) and checked for stemness by flow cytometry as previously described.³⁸ DP-MSCs were passaged 2–3 times before being incorporated into the fibrin hydrogel formulation ($1667\text{ cells per }\mu\text{L}$). Cellularized formulations were then poured into 96-well plates for polymerization and cultured in $120\text{ }\mu\text{L}$ Optistem[®] medium.

2.7 Cell viability determination

Cytotoxicity was determined after 48 h of culture in NP-free fibrin hydrogels and in fibrin hydrogels containing 0.2% solid content PLA-NPs, CLIN-PLA-NPs, or the equivalent $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN, using a Live/Dead Cell Double Staining[®] kit (Sigma Aldrich, France). Experiments were performed in triplicate using three different PLA-CLIN-NPs and PLA-NPs batches and DP-MSCs from two female patients (13 and 14 year old). DP-MSCs viability is defined as the percentage of living cells compared to total cells. Briefly, hydrogels were quickly rinsed three times with PBS and incubated for 15 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a PBS solution containing $0.2\text{ }\mu\text{M}$ acetoxymethyl ester of calcein and $0.2\text{ }\mu\text{M}$ propidium iodide. They were then observed using an Eclipse TE300 fluorescence microscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands) and cells were counted using the Fiji software. Negative controls were realized by replacing DP-MSCs with PBS to confirm signal specificity.

2.8 Type I collagen immunohistochemistry

Type I collagen synthesis by DP-MSCs was determined using immunohistochemistry as described previously²⁰ with slight modifications. Briefly, DP-MSCs were cultured for 7 days in fibrin-alone, fibrin/CLIN-PLA-NP or fibrin/PLA-NP hydrogels as described in Section 2.7. Hydrogels were fixed in acidified formal alcohol (AFA; Microm Microtech, France) at $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and classically embedded in paraffin. Five μm serial sections were cut, deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval, sections were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ first in 0.5% hyaluronidase diluted in PBS for 1 h then in Pepsin Reagent (ref R2283, Sigma Aldrich, France) for 15 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections in 0.5% hydrogen peroxide for 10 min at RT. To reduce non-specific binding of antibodies, sections were treated with BlockAid[™] (Thermo Fisher Scientific, USA) at RT for 1 h. Sections were then incubated with the anti-type I collagen rabbit polyclonal antibody (1/2000) (ref. 20111[380k], Novotec, Bron, France) overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antibody detection was performed with an ImmPRESS[®] HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection kit (Vector Laboratories, USA). Sections were finally counterstained with hematoxylin, mounted with DEPEX medium (ref 06522, Sigma Aldrich, France) and observed with an Eclipse TE300 microscope.

2.9 Statistical analyses

Data are presented as the mean values \pm standard deviation. Statistical analyses were performed on GraphPad Prism version



7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) using ANOVA followed by multiple comparison using statistical hypothesis testing and Bonferroni correction. The number of samples (N) is indicated in figure captions. A difference among means with a P -value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Characterization of the nanoparticles with or without clindamycin

The CLIN-PLA-NPs were synthesized by the surfactant-free nanoprecipitation method³⁶ which includes three stages: an initial nucleation stage, a growth phase, and the formation of stable particles when an equilibrium is reached. A small size distribution results from a high nucleation rate and a low growth of particles.⁴¹ At high pH, the carboxylic acid groups of the PLA polymer are highly ionized, leading to a rapid stabilization of the nanoparticles driven by electrostatic repulsions between them. This method is applicable for the encapsulation of lipophilic or amphiphilic compounds, driven by hydrophobic interactions with the polymer,⁴² as previously characterized by molecular modelling.³⁶

The CLIN-PLA-NPs exhibited a Z -average size of 159 ± 2 nm and a polydispersity index of 0.09 ± 0.01 which indicated a relatively narrow particle size distribution (Table 1). PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs exhibited a regular spherical morphology, were fairly uniform in size and did not show any form of aggregation (Fig. 2A–D). The zeta potential of -60 ± 2 mV was negative according to the net charge of PLA in the storage buffer (pH 8.5). CLIN incorporation into PLA-NPs did not significantly modify their diameter, PDI, zeta potential, or morphology. Entrapment efficiency was $43 \pm 7\%$, a value corresponding to a drug loading of 10 ± 2 μg CLIN per mg PLA (Table 1). The profile of clindamycin release from PLA nanoparticles was evaluated for 9 days in PBS at 37°C . It was characterized by a fast burst release of more than 60% of the clindamycin loaded onto the nanoparticles (Fig. 2E).

3.2 Antibacterial and antibiofilm properties of CLIN-PLA-NPs

To assess the antimicrobial properties of CLIN-PLA-NPs, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *E. faecalis*

Table 1 PLA-NP and CLIN-PLA-NP hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential. Values are the mean \pm standard deviation of different batches ($N = 3$ for PLA-NPs and $N = 5$ for CLIN-PLA-NPs). Entrapment efficiency and drug loading (μg CLIN per mg PLA) were determined by CLIN quantification using HPLC. No significant difference (P -value < 0.05) was observed among means diameter, PDI or zeta potential using ANOVA followed by multiple comparison using statistical hypothesis testing and Bonferroni correction

	PLA-NPs	CLIN-PLA-NPs
Hydrodynamic diameter (nm)	155 ± 2	159 ± 2
Polydispersity index	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Zeta potential (mV)	-66 ± 3	-60 ± 2
Entrapment efficiency (%)	—	43 ± 7
Drug loading (μg mg^{-1})	—	10 ± 2

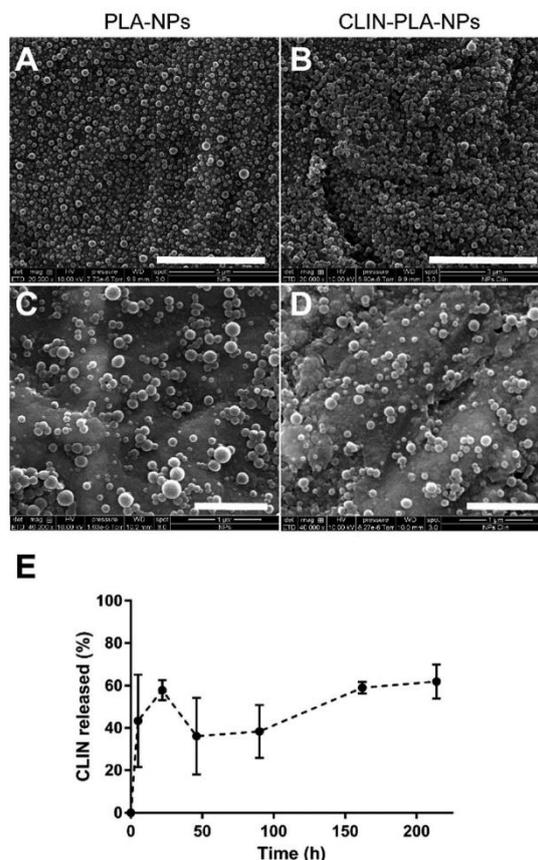


Fig. 2 Representative SEM images of PLA-NPs (A and C) and CLIN-PLA-NPs (B and D) at low and high magnification. Scale bars: $3 \mu\text{m}$ (top) and $1 \mu\text{m}$ (bottom). Profile of clindamycin release from the nanoparticles in PBS at 37°C ($N = 3$) (E).

was determined according to the broth microdilution method, in the presence of serial concentrations of clindamycin (0.004 to $256 \mu\text{g mL}^{-1}$), free or loaded onto nanoparticles (respectively CLIN and CLIN-PLA-NPs), or equivalent concentrations of empty PLA-NPs (0.016 to 1.02% solid content). A similar value of $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ was obtained for free CLIN and CLIN-PLA-NPs (Table 2), whereas PLA-NPs were unable to inhibit *E. faecalis* growth. To evaluate the ability of CLIN-PLA-NPs to prevent biofilm formation or degrade a 24 hour old biofilm, MBIC_{50} and MBEC_{50} were estimated by measuring *E. faecalis* biofilm density after crystal violet staining. The MBIC_{50} , defined as the lowest CLIN concentration that results in a 50% inhibition of biofilm formation, was found to be $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CLIN-PLA-NPs and free CLIN. PLA-NPs did not inhibit *E. faecalis* biofilm formation. The MBEC_{50} , defined as the lowest CLIN concentration that eradicates 50% of a 24 hour old biofilm, was determined following the addition of free CLIN, CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs on a 24 hour old biofilm. It was found to be $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CLIN-PLA-NPs and free CLIN, whereas PLA-NPs did not affect the biofilm.



Table 2 CLIN and NP antibacterial and antibiofilm properties ($N = 3$)

	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBIC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBEC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CLIN	32	4	16
CLIN-PLA-NPs	32	4	16
PLA-NPs	> 256	> 256	> 256

3.3 Antimicrobial properties of the nanocomposite hydrogel

To assess the antimicrobial properties of the nanocomposite hydrogel, agar diffusion assays were designed by plating hydrogel formulations containing fibrin alone (control) or fibrin supplemented with 50–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of free (CLIN) or clindamycin-loaded nanoparticles (CLIN-PLA-NPs), or with equivalent concentrations of free PLA-NPs (0.2–0.8% solid content) on *E. faecalis*-seeded agar dishes (Fig. 3A). Fibrin hydrogels containing clindamycin or clindamycin-loaded nanoparticles clearly inhibited *E. faecalis* growth in a dose-dependent manner, whereas the fibrin hydrogel loaded with PLA-NPs did not exhibit any antimicrobial activity (Fig. 3B).

3.4 Nanocomposite hydrogel formulation

A nanocomposite hydrogel containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin in free form or loaded onto nanoparticles, which corresponds to 0.2% solid content of PLA, was formulated to provide the hydrogel with efficient antibacterial and antibiofilm properties. Fibrin hydrogel microstructure was then analysed at high magnification using SEM. Fibrin formed a loose meshwork (Fig. 4A). Clindamycin-loaded nanoparticles appeared localized within the holes of the meshwork and/or in close contact with fibrin (Fig. 4B). Cumulative clindamycin release from fibrin hydrogels was assessed to determine the impact of the formulation on the release of the antibiotic. After 24 h, $54.0 \pm 0.9\%$ and $43.5 \pm 1.9\%$ of the clindamycin was released from the fibrin hydrogel when it was added under the free form or in addition to empty nanoparticles respectively, while only $24.8 \pm 3.0\%$ of the initially introduced clindamycin was released from the nanocomposite hydrogel formulated with clindamycin-loaded nanoparticles (Fig. 4C). This suggests that clindamycin-loaded nanoparticles restrain CLIN release from the hydrogel.

To investigate the release of nanoparticles from the hydrogel and their distribution within the hydrogel, green-fluorescent NPs (PLA-fluo-NPs) were used. No release of the fluorophore from the particles into the aqueous medium (PBS) was observed within the four days of the experiment (ESI† 2). NPs appeared homogeneously distributed in the fibrin hydrogel and did not form agglomerates or patchwork (Fig. 4D). Time-course analyses of PLA-fluo-NP release were then performed from hydrogels incorporated with or without DP-MSCs. Cumulative release profiles highlighted a complete release of the free fluorophore from the fibrin hydrogel after 4 days in the presence or absence of DP-MSCs, demonstrating that the fluorophore was not trapped by the fibrin hydrogel (Fig. 4E). After the same time, $61.3 \pm 6.7\%$ and $49.3 \pm 12.4\%$ of PLA-fluo-NPs were released from cellularized and non-cellularized hydrogels, the difference being not significant.

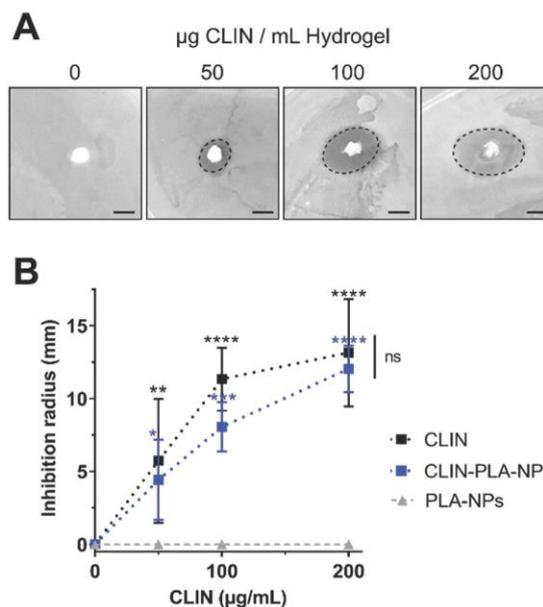


Fig. 3 (A) Representative pictures of agar diffusion assays in the presence of the fibrin-alone hydrogel (far left) or fibrin hydrogels loaded with CLIN-PLA-NPs to get final concentrations of 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CLIN. Scale bar is 10 mm. (B) Graphical representation reporting the inhibition radius in the presence of 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN (black squares) or 2, 4 or 8 mg mL^{-1} CLIN-PLA-NPs (blue squares) or PLA-NPs (grey triangles). $N = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. PLA-NPs as control. Differences between free CLIN and CLIN-PLA-NPs are not significant (ns).

3.5 Nanocomposite hydrogel cytotoxicity

CLIN-PLA-NP toxicity on DP-MSCs was investigated using a Live/Dead[®] assay and fluorescence imaging (Fig. 5A–D). After 48 h of culture, similar percentages of living DP-MSCs were observed in the presence of empty or clindamycin-loaded nanoparticles ($77 \pm 4\%$ and $75 \pm 3\%$, respectively) (Fig. 5E). Values were not statistically different from control cultures (in absence of NPs) or in the presence of free CLIN which showed $78 \pm 7\%$ and $73 \pm 3\%$ of living cells, respectively (Fig. 5E).

To confirm that NPs did not alter DP-MSC functionality, the synthesis of type I collagen, the main component of DP ECM, was assessed by immunohistochemistry after 7 days of culture (Fig. 6). While no staining was detected in the controls performed without primary antibody (Fig. 6A and B), we observed that DP-MSCs produced type I collagen both in the fibrin-alone hydrogel (Fig. 6C) and in the fibrin hydrogel containing CLIN-PLA-NPs (Fig. 6D).

4. Discussion

This paper reports the development of an innovative fibrin-based hydrogel supplemented with antibiotic-loaded PLA-NPs to establish an aseptic environment favourable to tissue regeneration. Antimicrobial properties were provided to the hydrogel



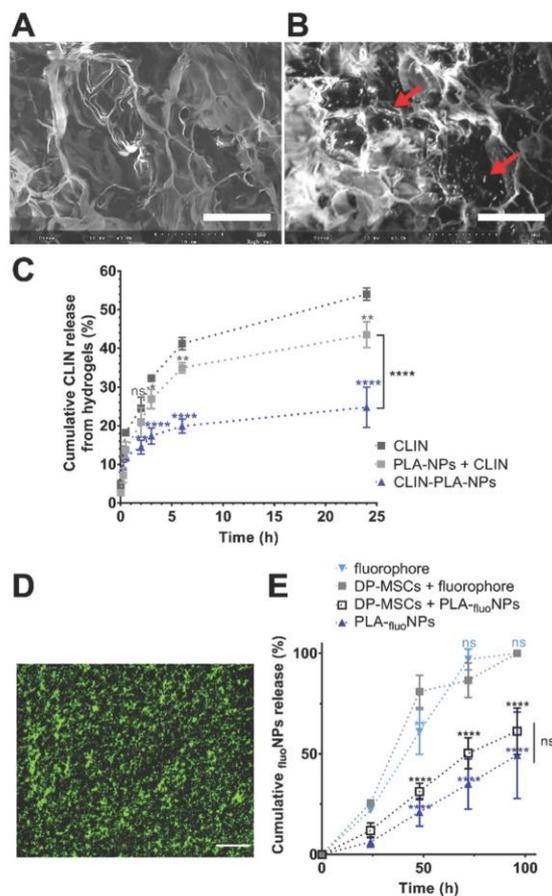


Fig. 4 Representative SEM pictures of the microstructure of a fibrin-alone hydrogel (A) and of a fibrin hydrogel containing CLIN-PLA-NPs (B). NPs are indicated by red arrows for illustration. Scale bar: 10 μm . (C) Cumulative release of CLIN from fibrin hydrogels formulated with free CLIN, free CLIN + empty PLA-NPs, or CLIN encapsulated in PLA-NPs ($N = 3$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ vs. free CLIN control. The statistical difference between PLA-NPs + CLIN and CLIN-PLA-NPs at 24 h is indicated by a bracket. No significant difference was observed below 2 h. (D) Distribution of PLA- Fluo -NPs within the fibrin hydrogel. Scale bar: 25 μm . (E) Graphical representation showing the cumulative release of PLA- Fluo -NPs from non-cellularized or DP-MSC-containing hydrogels (dark blue triangles and empty black squares, respectively), and of the fluorophore from non-cellularized or DP-MSC-containing hydrogels (light blue triangles and gray squares, respectively). The fluorophore alone was used as a control. Released fluorescence is expressed as the percentage of the starting one incorporated into the hydrogel. $N = 3$. $****P < 0.0001$ vs. free fluorophore as control. No significant difference was observed below 48 h. Differences between DP-MSCs + PLA- Fluo -NPs and PLA- Fluo -NPs are not significant (ns).

via clindamycin-loaded nanoparticles. NPs have been proposed in dentistry for various clinical applications including endodontic space (root canal) disinfection.^{23,43,44} Most studies relied on the use of metal-based NPs (silver, gold, copper oxide, iron oxide or zinc oxide) which are known to have intrinsic antimicrobial properties.⁴⁵ However, the eco and cytotoxicity of these NPs is a

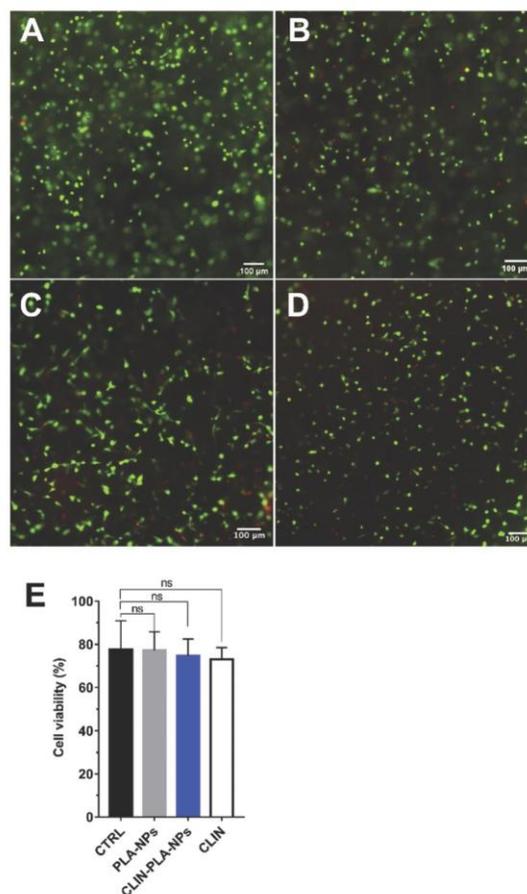


Fig. 5 Cell viability assessment with the Live/Dead[®] assay. (A–D) Representative pictures of DP-MSCs stained after culture for 48 h in a fibrin-alone hydrogel (A) or in a fibrin hydrogel containing 0.2% solid content PLA-NPs (B) or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin-loaded nanoparticles (0.2% solid content) (C), or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN (D). Scale bar: 100 μm . (E) Graphical representation of DP-MSC viability in the fibrin-alone hydrogel (CTRL) or in the presence of 0.2% solid content PLA-NPs or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin loaded onto nanoparticles (CLIN-PLA-NPs), or free (CLIN) ($N = 6$; ns: not significant).

major drawback that still remains to be solved.²³ For this reason, non-metal polymeric 160–230 nm NPs made of chitosan or polylactic-*co*-glycolic acid (PLGA) were incorporated into toothpastes to deliver the antiseptic chlorhexidine in the dental biofilm. However, they displayed an *in vitro* toxicity between 20 and 60% on human gingival fibroblasts,⁴⁶ which precluded their clinical use. Therefore, designing novel NP formulations that are both antimicrobial and non-cytotoxic is required.

NP formation and drug entrapment efficiency (EE) depend on several parameters including the chemical synthesis method, the nature of the selected solvent, and the physicochemical properties of the drug.⁴⁷ By using a solvent diffusion method previously reported,³⁶ we obtained PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs with similar hydrodynamic diameters (about 155–160 nm), polydispersity



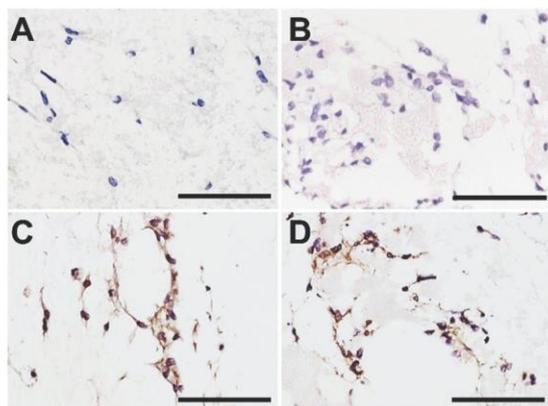


Fig. 6 Representative pictures of type I collagen immunostaining after 7 days of culture of DP-MSCs in a fibrin-alone hydrogel (A and C) or in a fibrin hydrogel containing 2 mg mL^{-1} CLIN-PLA-NPs (B and D). Controls without the primary antibody (A and B). Scale bar: $20 \mu\text{m}$.

index (0.09) and zeta potential values (about -65 mV). This suggests that the CLIN incorporation did not significantly modify the physical parameters of PLA-NPs. Particle size influences many properties and it is therefore important to characterize precisely this physicochemical parameter. DLS data are not sufficient to assess particles' size and size distribution because this method is intensity-based and therefore more sensitive to large particles. We accordingly used SEM which allows a number-based particles' size measurement. SEM results highlighted a large number of small-sized particles. In addition, particles observed by SEM were dehydrated, which may lead to their artificial compaction compared to DLS measurements.

Nanoparticle synthesis by nanoprecipitation was conducted in carbonate buffer at pH 10. At this pH, clindamycin, which exhibits a pK_a of 7.6, is to a very small extent ionized and therefore less soluble than in water. This reduced solubility results in a decreased diffusion of clindamycin in the aqueous phase during the nanoprecipitation process, favouring its coprecipitation with the hydrophobic polymer. The entrapment rate into PLA particles is thus enhanced in carbonate buffer compared to nanoprecipitation in water for example. Such a phenomenon was previously described by Govender *et al.* with procaine hydrochloride as a drug and PLGA as a polymer.⁴⁸ We thus obtained a drug loading of $10 \pm 2 \mu\text{g}$ CLIN per mg PLA and an entrapment efficiency of $43 \pm 7\%$. These values were higher than those obtained during PLGA-nanosphere vectorization of antibiotics such as minocycline which was reported to give the highest EE (29.9%).⁴⁹ Higher antibiotic EE could only be obtained with the use of surfactants,^{29,31} but the latter are known to be deleterious for many host cells and tissues. On the contrary, one major benefit of our CLIN-PLA-NPs is that they were prepared following a protocol that did not need any surfactant or stabilizer that may be pro-inflammatory or toxic for cells incorporated into or close to the fibrin hydrogel.

The lincosamide antibiotic CLIN inhibits bacterial protein synthesis by acting at the level of the 50S ribosome.³² It was

chosen in this study to provide the hydrogel with antimicrobial properties for various reasons, first owing to its broad spectrum activity and its routine use in oral medicine in patients allergic to β -lactams such as amoxicillin.³² CLIN is for these patients the antibiotic of choice for treating oral infections or to prevent endocarditis.⁵⁰ Interestingly, CLIN has the original ability to stimulate the host immune system by promoting the mobilization and chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes to the infected sites.⁵⁰ This property may be highly valuable to attract, into the fibrin scaffold, periodontal/blood immune cells in order to potentiate the CLIN antibacterial effect. CLIN was also shown to promote angiogenesis, another interesting property in the context of DP regeneration where the development of new vessels into the endodontic space is needed.⁵¹ Finally, CLIN was selected as an example of antibiotic since it can be easily incorporated into PLA-NPs owing to its positive charge and hydrophobicity.^{33–35}

Antibacterial properties of CLIN-PLA-NPs were assessed on *E. faecalis*, a microorganism frequently found in persistent endodontic infections, hard to eradicate and responsible for many endodontic treatment failures.⁵² The MIC of $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ reported in this work for the *E. faecalis* ATCC[®] 47077TM strain in the presence of CLIN-PLA-NPs was the same as for free CLIN, suggesting that CLIN incorporation into PLA-NPs did not decrease its antimicrobial properties. It was similar to the MIC reported by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for *E. faecalis* growth inhibition by CLIN. CLIN was found to be efficient at relatively high concentration, but its incorporation into PLA-NPs could strongly limit its putative systemic effects and adverse reactions.⁵³ Experiments in animal models are on-going to investigate *in vivo* the safety of CLIN-PLA-NPs and the ability of this innovative medical device to promote DP regeneration. Interestingly, CLIN-PLA-NPs were able to inhibit the formation of an *E. faecalis* biofilm. This result contrasts with the reported inability of CLIN-containing electrospun nanofibers to inhibit the formation of *E. faecalis* and *Actinomyces naeslundii* biofilms in the absence of ciprofloxacin and metronidazole.¹⁸ We suggest that this difference is due to the presence of PLA-NPs which are known to protect the structure of the drug, enhance its bioavailability and biodistribution, and ensure a high local antibiotic concentration.²³ It may also be a result of the microstructure of the fibrin hydrogel which could allow for a better diffusion of the antibiotic through the meshwork.⁵⁴ Indeed, the agar diffusion assay clearly displayed that CLIN-PLA-NPs progressively released from the hydrogel efficiently inhibited *E. faecalis* growth, in a similar way to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN incorporated into the hydrogel. This result demonstrates that CLIN-PLA-NPs maintain their activity upon incorporation within the nanocomposite hydrogel. Other works have demonstrated that CLIN inhibits *Streptococcus aureus* biofilm formation,⁵⁵ and the MBIC₅₀ results reported here extend the CLIN antibiofilm property to *E. faecalis*. In addition, our MBEC₅₀ data indicates that CLIN-PLA-NPs can induce *E. faecalis* biofilm dispersal. This property may be highly valuable in the context of DP regeneration since the eradication of the endodontic bacterial biofilm



present on the dentin wall or deeply entrapped in dentin tubules remains a major challenge to REPs.^{14,15,56}

Investigation of the nanocomposite hydrogel microstructure using SEM showed that the fibrin formed a loose meshwork with CLIN-PLA-NPs that seemed to be free and/or in contact with the fibrin fibrils. Time-course analysis of CLIN release from the hydrogel revealed that, after 24 h, CLIN was released approximately two times slower from the hydrogel when it was loaded onto PLA nanoparticles compared to free CLIN. Clindamycin release from nanoparticles in a physiological buffer (PBS at 37 °C) was rapid, which suggests the dissolution of the drug which is close to the surface and, accordingly, rapidly available. The small size of the particles, characterized by a large surface to volume ratio, may enhance this effect. These results suggest that the CLIN-PLA-NPs allows for the maintenance of the CLIN within the nanocomposite hydrogels in comparison to free CLIN. Since HPLC equipped with UV/Visible detection at 200 nm is prone to background-limited sensitivity, our study of clindamycin release from the hydrogel was restricted to 24 h. Further studies are necessary to precisely characterize the time-course release of clindamycin from the various fractions of this three component system, using for example a more accurate detection method such as HPLC-MS/MS.⁵⁷ The use of fluorescent PLA-based nanoparticles demonstrated that the NPs were homogeneously distributed into the hydrogel and did not form aggregates. Time-course analyses further revealed that PLA-_{fluo}NPs were progressively released from the hydrogel into the medium without any impact of the DP-MSCs on the NP release profile. This result indicates that the nanocomposite hydrogel could be used for a cellularized approach of REPs. Altogether, these results suggest that the hydrogel may constitute a reservoir capable of bringing NP close to the dentin wall after injection into the endodontic space. This property is extremely valuable to destroy bacterial biofilms present on the dentin surface and in dentin tubules.⁵⁸ This finding suggests that the use of PLA-NPs as a CLIN carrier and their progressive release from the hydrogel could allow for a prolonged effect of the antibiotic by maintaining high drug concentration within the hydrogel and at its periphery compared to the drug alone. This could provide a suitable environment lasting long enough to allow the formation of a novel immunocompetent DP-like tissue. It is possible that the hydrophobic nature of both fibrin and PLA could be involved in the progressive release of the NPs from the hydrogel. However, the precise mechanisms by which NPs are maintained into the hydrogel and released from it remain to be solved. Deciphering the close relationships that we observed between NPs and the fibrin network will help answer this question.

The biocompatibility of the nanocomposite hydrogel was assessed on DP-MSCs. Cell viability was found to be about 75% after 48 h of culture in the presence of CLIN-PLA-NPs, which corresponds to the ISO 10993-5 standards that require at least 70% cell viability.⁵⁹ These results are similar to those reported for various types of mesenchymal stem cells, including DP-MSCs, seeded in a fibrin scaffold.^{11,60} They are higher than the DP-MSC viability of 50–60% measured in clindamycin,

ciprofloxacin and metronidazole-loaded electrospun nanofibers.¹⁹ This difference may be due to the high biocompatibility reported for fibrin scaffolds compared to synthetic ones.¹¹ At the functional level, our immunostaining experiments showed that DP-MSCs cultured within fibrin-alone and CLIN-PLA-NP-containing hydrogels synthesized type I collagen, which confirms the previously reported safety of fibrin-based scaffolds for DP-MSCs.²⁰ Our results are consistent with a recent study reporting that CLIN was safe for DP-MSCs *in vitro* in the same range of concentrations (*i.e.* below 500 µg mL⁻¹).⁵¹ However, the mechanism of action of CLIN on DP-MSCs within the nanocomposite hydrogel deserves further characterization to determine the real impact of the antibiotic on cell differentiation and hydrogel degradation in favour of dental pulp matrix neo-synthesis.

5. Conclusions

In the present study, we successfully developed an innovative, antibacterial and biocompatible hydrogel that may be valuable for DP regeneration in a previously infected endodontic space. CLIN-loaded PLA-NPs released from the hydrogel displayed antibiotic and antibiofilm properties that could overcome a major challenge of REPs which is the persistence, in the endodontic space, of bacteria that hamper the DP regeneration process. Work is on-going to determine what proportion of NPs accumulate along the dentin wall and penetrate into the micrometer-sized dentin tubules. Investigations of the antibacterial properties of these NPs loaded with CLIN or other antibiotic molecules against multispecies endodontic biofilms are also in progress. We believe that the presented technology could be transferable to other tissue engineering and regenerative medicine strategies where aseptis is difficult to reach by conventional disinfection means.

Author contributions

BV, FMG and JCF conceived the original idea. JCF and MD designed the study, supervised the work and wrote the article. MBe analysed the results and drafted the article. MBo, FC and ML synthesized and characterized the CLIN-PLA-NPs. MBo performed the release analyses and assessed the antimicrobial properties. MBe prepared the samples for SEM analyses and immunohistochemistry. SG extracted and characterized the DP-MSCs. MP and AC performed the Live/Dead analyses. CP synthesized the PLA-_{fluo}NPs. DD performed the biofilm analyses. CP and DD gave technical advices regarding NPs synthesis and characterizations.

Conflicts of interest

BV, DD and CP work for the Adjuvatis[®] company which manufactured PLA-NPs and have accordingly a commercial interest. However, these authors only supplied the material and were not involved in data analyses or interpretation.



Acknowledgements

This work was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS) and the French Institute for Odontological Research (IFRO). DDC is a recipient of a CIFRE PhD grant from the French National Association of Research and Technology (ANRT). ML was supported by a PhD studentship of the *Ligue contre le Cancer* (France) for three years. The authors acknowledge the contribution of Adjuvatis[®] for providing PLANPs and its expertise in the NP domain, and the *Centre Technologique des Microstructures* (Université Lyon 1, Villeurbanne, France) for help with electron microscopy. Immunohistochemistry experiments were performed by N. El Kholti in the PRIMATISS facility housed in the laboratory (UMR 5305 CNRS/Université Lyon 1).

References

- J. J. Mao, S. G. Kim, J. Zhou, L. Ye, S. Cho, T. Suzuki, S. Y. Fu, R. Yang and X. Zhou, *Dent. Clin. North Am.*, 2012, **56**(3), 639–649.
- A. Diogenes, N. B. Ruparel, Y. Shiloah and K. M. Hargreaves, *J. Am. Dent. Assoc., JADA*, 2016, **147**(5), 372–380.
- T. Gong, B. C. Heng, E. C. M. Lo and C. Zhang, *Stem Cells Int.*, 2016, **2016**, 9204574.
- M. Ducret, H. Fabre, A. Celle, F. Mallein-Gerin, E. Perrier-Groult, B. Alliot-Licht and J. C. Farges, *Biomed. Mater. Eng.*, 2017, **28**(s1), S159–S168.
- T. Morotomi, A. Washio and C. Kitamura, *Jpn Dent. Sci. Rev.*, 2019, **55**(1), 5–11.
- K. M. Galler, R. N. D'Souza, J. D. Hartgerink and G. Schmalz, *Adv. Dent. Res.*, 2011, **23**(3), 333–339.
- V. Rosa, A. Della Bona, B. N. Cavalcanti and J. E. Nör, *Dent. Mater.*, 2012, **28**(4), 341–348.
- M. T. Albuquerque, M. C. Valera, M. Nakashima, J. E. Nör and M. C. Bottino, *J. Dent. Res.*, 2014, **93**(12), 1222–1231.
- P. J. Palma, J. C. Ramos, J. B. Martins, A. Diogenes, M. H. Figueiredo, P. Ferreira, C. Viegas and J. M. Santos, *J. Endod.*, 2017, **43**(8), 1279–1287.
- C. C. Huang, R. Narayanan, N. Warshawsky and S. Ravindran, *Front. Physiol.*, 2018, **9**, 495.
- K. M. Galler, F. P. Brandl, S. Kirchhof, M. Widbillier, A. Eidt, W. Buchalla, A. Göpferich and G. Schmalz, *Tissue Eng., Part A*, 2018, **24**(3–4), 234–244.
- Y. Li, H. Meng, Y. Liu and B. P. Lee, *Sci. World J.*, 2015, **2015**, 685690.
- A. F. Fouad, *Adv. Dent. Res.*, 2011, **23**(3), 285–289.
- L. Vishwanat, R. Duong, K. Takimoto, L. Phillips, C. O. Espitia, A. Diogenes, S. B. Ruparel, D. Kolodrubetz and N. B. Ruparel, *J. Endod.*, 2017, **43**(6), 916–922.
- P. Verma, A. Nosrat, J. R. Kim, J. B. Price, P. Wang, E. Bair, H. H. Xu and A. F. Fouad, *J. Dent. Res.*, 2017, **96**(1), 100–106.
- M. C. Bottino, K. Kamocki, G. H. Yassen, J. A. Platt, M. M. Vail, Y. Ehrlich, K. J. Spolnik and R. L. Gregory, *J. Dent. Res.*, 2013, **92**(11), 963–969.
- J. Palasuk, K. Kamocki, L. Hippenmeyer, J. A. Platt, K. J. Spolnik, R. L. Gregory and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2014, **40**(11), 1879–1884.
- K. Kamocki, J. E. Nör and M. C. Bottino, *Int. Endod. J.*, 2015, **48**(12), 1147–1156.
- A. Karczewski, S. A. Feitosa, E. I. Hamer, D. Pankajakshan, R. L. Gregory, K. J. Spolnik and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2018, **44**(1), 155–162.
- M. Ducret, A. Montebault, J. Josse, M. Pasdeloup, A. Celle, R. Benchrih, F. Mallein-Gerin, B. Alliot-Licht, L. David and J. C. Farges, *Dent. Mater.*, 2019, **35**(4), 523–533.
- N. Ruangsawasdi, M. Zehnder and F. E. Weber, *J. Endod.*, 2014, **40**(2), 246–250.
- H. Redl, G. Schlag, G. Stanek, A. Hirschl and T. Seelich, *Biomaterials*, 1983, **4**(1), 29–32.
- L. Wang, C. Hu and L. Shao, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 1227–1249.
- K. Forier, K. Raemdonck, S. C. De Smedt, J. Demeester, T. Coenye and K. Braeckmans, *J. Controlled Release*, 2014, **190**, 607–623.
- W. S. Cheow and K. Hadinoto, *Methods Mol. Biol.*, 2014, **1147**, 227–238.
- B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki and H. Brem, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, **107**, 163–175.
- A. Mahapatro and D. K. Singh, *J. Nanobiotechnol.*, 2011, **9**, 55.
- V. Pavot, M. Berthet, J. Rességuier, S. Legaz, N. Handké, S. C. Gilbert, S. Paul and B. Verrier, *Nanomedicine*, 2014, **9**(17), 2703–2718.
- D. M. Casa, T. C. Carraro, L. E. de Camargo, L. F. Dalmolin, N. M. Khalil and R. M. Mainardes, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2015, **15**(1), 848–854.
- W. Yao, P. Xu, Z. Pang, J. Zhao, Z. Chai, X. Li, H. Li, M. Jiang, H. Cheng, B. Zhang and N. Cheng, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 3963–3970.
- E. Pancani, M. Menendez-Miranda, A. Pastor, F. Brisset, M. F. Bernet-Camard, D. Desmaële and R. Gref, *Acta Pharm. Sin. B*, 2018, **8**(3), 420–431.
- M. Smieja, *Can. J. Infect. Dis.*, 1998, **9**(1), 22–28.
- S. J. Siegel, J. B. Kahn, K. Metzger, K. I. Winey, K. Werner and N. Dan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, **64**(3), 287–293.
- P. Gao, X. Nie, M. Zou, Y. Shi and G. Cheng, *J. Antibiot.*, 2011, **64**(9), 625–634.
- S. R. Shah, A. M. Henslee, P. P. Spicer, S. Yokota, S. Petrichenko, S. Allahabadi, G. N. Bennett, M. E. Wong, F. K. Kasper and A. G. Mikos, *Pharm. Res.*, 2014, **31**(12), 3379–3389.
- M. Lamrayah, F. Charriaud, S. Hu, S. Megy, R. Terreux and B. Verrier, *Int. J. Pharm.*, 2019, **568**, 118569.
- K. Na-Bangchang, V. Banmairuroi, B. Kamanikom and D. Kiod, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2006, **37**(1), 177–184.
- L. Thieme, M. Klinger-Strobel, A. Hartung, C. Stein, O. Makarewicz and M. W. Pletz, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2018, **73**(6), 1553–1561.
- H. Fabre, M. Ducret, O. Degoul, J. Rodriguez, E. Perrier-Groult, E. Aubert-Foucher, M. Pasdeloup, C. Auxenfans,



- C. McGuckin, N. Forraz and F. Mallein-Gerin, *Stem Cells Int.*, 2019, **2019**, 2186728.
- 40 M. Ducret, H. Fabre, J. C. Farges, O. Degoul, G. Atzeni, C. McGuckin, N. Forraz, F. Mallein-Gerin and E. Perrier-Groult, *J. Endod.*, 2015, **41**(9), 1492–1499.
- 41 J. Tao, S. F. Chow and Y. Zheng, *Acta Pharm. Sin. B*, 2019, **9**(1), 4–18.
- 42 M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg and G. Golomb, *J. Controlled Release*, 2002, **83**(3), 389–400.
- 43 R. A. Bapat, C. P. Joshi, P. Bapat, T. V. Chaubal, R. Pandurangappa, N. Jnanendrapa, B. Gorain, S. Khurana and P. Kesharwani, *Drug Discovery Today*, 2019, **24**(1), 85–98.
- 44 M. Samiei, A. Farjami, S. M. Dizaj and F. Lotfipour, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **58**, 1269–1278.
- 45 M. Polivková, T. Hubáček, M. Staszek, V. Švorčík and J. Siegel, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(2), 419.
- 46 L. Chronopoulou, G. Nocca, M. Castagnola, G. Paludetti, G. Ortaggi, F. Sciubba, M. Bevilacqua, A. Lupi, G. Gambarini and C. Palocci, *New Biotechnol.*, 2016, **33**(1), 23–31.
- 47 J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz and P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**(3), 1147–1235.
- 48 T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum and S. S. Davis, *J. Controlled Release*, 1999, **57**(2), 171–185.
- 49 T. S. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandiyari-Manesh, S. M. Marashi, N. Samadi, S. M. Fatemi, F. Atyabi, S. Eshraghi and R. Dinarvand, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 221–234.
- 50 I. Brook, M. A. Lewis, G. K. Sándor, M. Jeffcoat, L. P. Samaranyake and J. Vera Rojas, *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.*, 2005, **100**(5), 550–558.
- 51 N. Dubey, J. Xu, Z. Zhang, J. E. Nör and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2019, **45**(7), 882–889.
- 52 A. A. Hoelscher, J. K. Bahcall and J. S. Maki, *J. Endod.*, 2006, **32**(2), 145–147.
- 53 M. H. Thornhill, M. J. Dayer, M. J. Durkin, P. B. Lockhart and L. M. Baddour, *J. Dent. Res.*, 2019, **98**(10), 1081–1087.
- 54 J. Chotitumnavee, T. Parakaw, R. L. Srisatjaluk, C. Pruksaniyom, S. Pisitpipattana, C. Thanathipanont, T. Amarasingh, N. Tiankhum, N. Chimchawee and N. Ruangsawasdi, *J. Dent. Sci.*, 2019, **14**(1), 7–14.
- 55 K. Schilcher, F. Andreoni, V. Dengler Haunreiter, K. Seidl, B. Hasse and A. S. Zinkernagel, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, **60**(10), 5957–5967.
- 56 S. N. Kaushik, B. Kim, A. M. Walma, S. C. Choi, H. Wu, J. J. Mao, H. W. Jun and K. Cheon, *Biomater. Res.*, 2016, **20**, 14.
- 57 M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena and P. Solich, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **649**(2), 158–179.
- 58 P. Neelakantan, M. Romero, J. Vera, U. Daood, A. U. Khan, A. Yan and G. S. P. Cheung, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(8), 1748.
- 59 A. L. B. Maçon, S. Li, J. J. Chung, A. Nommeots-Nomm, A. K. Solanki, M. M. Stevens and J. R. Jones, *J. Mater. Chem. B*, 2016, **4**(36), 6032–6042.
- 60 W. Ho, B. Tawil, J. C. Dunn and B. M. Wu, *Tissue Eng.*, 2006, **12**(6), 1587–1595.



Article

Molecular Dynamics Studies of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles and Their Interactions with Vitamin E and TLR Agonists Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄

Simon Megy ¹, Stephanie Aguero ¹, David Da Costa ^{2,3}, Myriam Lamrayah ², Morgane Berthet ², Charlotte Primard ³, Bernard Verrier ² and Raphael Terreux ^{1,*}

¹ PRABI (Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique), Lyon Gerland, UMR5305, LBTL, IBCP, Lyon 1 University, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon CEDEX 07, France; simon.megy@ibcp.fr (S.M.); stephanie.aguero@ibcp.fr (S.A.)

² Colloidal Vectors and Tissue Transport, UMR5305, LBTL, IBCP, Lyon 1 University, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon CEDEX 07, France; david.da-costa@adjuvatis.com (D.D.C.); myriam.lamrayah@ibcp.fr (M.L.); berthetmorgane@gmail.com (M.B.); Bernard.verrier@ibcp.fr (B.V.)

³ Adjuvatis, 7 Passage du Vercors, 69007 Lyon, France; charlotte.primard@adjuvatis.com

* Correspondence: raphael.terreux@ibcp.fr

Received: 16 October 2020; Accepted: 1 November 2020; Published: 5 November 2020

Abstract: Poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles (NPs) are widely investigated due to their bioresorbable, biocompatible and low immunogen properties. Interestingly, many recent studies show that they can be efficiently used as drug delivery systems or as adjuvants to enhance vaccine efficacy. Our work focuses on the molecular mechanisms involved during the nanoprecipitation of PLA NPs from concentrated solutions of lactic acid polymeric chains, and their specific interactions with biologically relevant molecules. In this study, we evaluated the ability of a PLA-based nanoparticle drug carrier to vectorize either vitamin E or the Toll-like receptor (TLR) agonists Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄, which are potent activators of the proinflammatory transcription factor NF- κ B. We used dissipative particle dynamics (DPD) to simulate large systems mimicking the nanoprecipitation process for a complete NP. Our results evidenced that after the NP formation, Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄ molecules end up located on the surface of the particle, interacting with the PLA chains via their fatty acid chains, whereas vitamin E molecules are buried deeper in the core of the particle. Our results allow for a better understanding of the molecular mechanisms responsible for the formation of the PLA NPs and their interactions with biological molecules located either on their surfaces or encapsulated within them. This work should allow for a rapid development of better biodegradable and safe vectorization systems with new drugs in the near future.

Keywords: polylactic acid; nanoparticles; molecular dynamics; dissipative particle dynamics; Pam₃CSK₄; Pam₁CSK₄; vitamin E; Toll-like receptor

1. Introduction

In the past few decades, nanomaterials have emerged as a research field with a very broad range of applications in areas such as chemistry, physics, biology, medicine and pharmaceutical science [1–6]. In the particular field of drug delivery, NPs provide several advantages, including (1) improved water-solubility of poorly soluble drugs [7–9], (2) enhanced drug stability in physiological environments [10–12], (3) controlled and sustained drug release [13–16] and (4) enhanced bioavailability [17–19]. Such particles are commonly made of non-toxic, amphiphilic, self-assembling

block polymers. In particular, the physico-chemical properties of particles made from biodegradable polymers have been extensively investigated over the last twenty years. As a result, biodegradable polymers are used in a wide array of medical applications, such as wound healing, tissue engineering, orthopedic devices, cardiovascular applications and vaccine administration [20]. In addition, the use of biodegradable polymers for NP production is safe and reliable. Moreover, particle size can be tuned by adjusting the polymer concentration and by changing the synthesis method [21]. This makes biodegradable NPs ideal vectors for drug and protein delivery, and also excellent candidates for the future of vaccine administration [22–24].

NPs can be produced from a wide range of biodegradable polymers, many of them having already been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). Among them, polylactic acid (PLA) has been widely investigated for drug release [25,26] and for vaccine delivery [27,28]. Indeed, the nontoxic effects of PLA and its degradation products make it a suitable candidate for biomedical application in drug delivery systems [29]. However, drug delivery remains a prominent challenge [30], mostly because of our limited understanding of all the numerous biological, chemical and physical processes at stake.

Molecular modeling can be used to provide a better understanding of how man-made NPs and various biomolecules interact together. Numerous examples have been studied in the past, including mostly gold [31,32] and carbon [33–35] NPs interacting with water molecules. Later on, several studies were published describing the molecular modeling of the interaction between proteins and peptides with gold NPs [36,37]. Silver NPs interacting with ubiquitin molecules have also been characterized using computational approaches [38], as have silica NPs interacting with various proteins, such as cytochrome C, RNase and lysozyme [39]. More recently, full atomistic simulations have been used to describe and predict the drug loading capacities of polymer NPs, namely, PLA-PEG NPs [40] used as nanoscale drug delivery systems.

Computational simulations provide an effective tool for gaining insights into the interaction of NPs with biomolecules. Although many studies of molecular dynamics on biomolecules and nanomaterials have been conducted over the last twenty years, their application to a better understanding of how these systems interact at an atomic level remains a challenge due to the huge sizes of the molecular systems involved. In fact, it is still extremely hard to make the full connection from atomistic length-scale to the macroscopic world, even though the behavior of these networks on larger scales is now reasonably well understood.

To gain insights into this problem, alternative methods can demonstrate great efficiency. In particular, a certain mesoscopic simulation technique for hydrodynamic behavior called dissipative particle dynamics (DPD) was first introduced by Hoogerbrugge and Koelman [41,42]. This technique is based on the simulation of soft spheres, whose motion is directed by collision rules. Polymers can also be simulated with the same technique by introducing bead-and-spring type particles [43,44]. Shortly after, the theoretical foundations of DPD dynamics were established by Español and Warren [45] who studied the fluctuation–dissipation theorem in connection with this method.

In the DPD approach, several atoms are united into a single simulation particle. Thus, this mesoscopic technique opens the way to large scale simulations, with systems encompassing up to millions of atoms. This allows one to bridge the gap from atomistic simulations to mesoscopic simulations wherein mesophases and network and particle formation can be studied [46]. With this method, one first performs simulations of molecular fragments using an all-atomistic approach and force fields accounting for all the atomistic details. This allows one to derive and calculate the particular solubility parameters for all the groups of atoms previously defined. Then these results can be used as inputs to a DPD simulation to study the formation of micelles, networks, particles and so forth. One of the first successful uses of this approach was the mesoscopic simulation of cell membrane damage by Groot and Rabone [47], where the authors evidenced that the membrane structure they obtained through their DPD approach quantitatively matched with full atomistic simulations.

In this study, our work highlights how DPD can be used as a successful investigation tool to better simulate and describe the formation of PLA NPs and their interactions with various molecules

of biological interest. In this paper, we focus on the biological roles of three molecules interacting with these PLA NPs during formation—first two small lipopeptides, and then the vitamin E molecule.

TLRs are a class of cell surface receptors involved in the front line of the immune response [48] [26]. Lipopeptides that are N-acetylated via glycerol-linked cysteines have been shown to be active against TLRs, which led to the development of molecules such as Pam₁CSK₄, Pam₂CSK₄ and Pam₃CSK₄. These commercially available molecules respectively possess one, two and three palmitoyl (Pam) hydrophobic chains. In Pam₁CSK₄, this chain is directly linked to a charged hydrophilic CSK₄ peptide. In Pam₂CSK₄ or Pam₃CSK₄, the two or three hydrophobic chains are linked to a modified glycerol unit, which is linked to the hydrophilic CSK₄ peptide. Loading these amphiphilic lipopeptides-onto PLA NPs would create a biodegradable delivery system with promising immune modulating properties.

Vitamin E is also a molecule which could benefit from better vectorization systems, as it exhibits strong hydrophobic properties and has very poor water solubility. A nanoscale, biodegradable carrier such as PLA NPs could greatly improve its bioavailability through better biodistribution and thus a better exploitation of its anti-oxidant effects.

We previously reported results for the study of the Pam₃CSK₄ molecule interacting with PLA NPs [26]. In this paper, we presented the successful experimental vectorization of Pam₃CSK₄ into PLA NPs by nanoprecipitation with a 99% entrapment efficiency and confirmed that the Pam₃CSK₄-loaded PLA NPs maintained their bioactivity on the TLR2 class of receptors. We also presented early results of molecular modeling for mechanisms involved in the nanoprecipitation formation process of PLA NPs, and their interactions with Pam₃CSK₄ molecules.

Here we present an updated version of our molecular modeling results, with a more comprehensive approach including new molecules, such as Pam₁CSK₄ and vitamin E, improved simulation parameters, longer simulation times, larger simulation systems and high-quality videos. We used some of our previous results to develop and validate the models presented in this study. In particular, we used our previous Pam₃CSK₄ calculations as a reference for further simulations of Pam₁CSK₄ and vitamin E. This allowed us to compare our results for the different molecules and thus validate our simulation parameters and protocols.

The two main goals of this work consisted of: (1) studying the PLA encapsulation processes of biological molecules of interest with different physicochemical properties and (2) establishing and validating a simulation protocol which could be used to predict the behavior of new molecules for future PLA NP encapsulation. In this regard, we first describe a molecular modeling comparison between the respective behaviors of Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄ in concentrated solutions. Then we go through the simulations of the nanoprecipitation processes for the formation of PLA NPs interacting with these two amphiphilic lipopeptides separately. Last, as a valid comparison point, we show similar computer simulations on the more hydrophobic vitamin E molecule. We compare our modeling results with the experimental *in vitro* results for the encapsulation of vitamin E also described in this paper. Finally, we compare the encapsulation processes of the three molecules reviewed in this article—vitamin E, Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄.

2. Materials and Methods

2.1. Pam₃CSK₄ Encapsulation into PLA NPs

Pam₃CSK₄'s *in vitro* encapsulation process has already been described [26]. Protocols for *in vitro* preparation of PLA NPs and for the Pam₃CSK₄ entrapment remained unchanged.

2.2. Vitamin E Encapsulation into PLA NPs

Polymeric NPs were produced by nanoprecipitation adapted from Fessi et al. [49]. PLA polymer was produced in the laboratory following the patent FR2745005A1 of Phusis (Grenoble, France) [50]. In summary, 1 g of poly(D,L-lactic acid) (MW = 50 kDa) was dissolved in 49.25 mL of acetone (Carlo Erba, Val de Reuil, France). Vitamin E ((±)- α -Tocopherol, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier,

France) was dissolved in acetone and 750 μL was added into the PLA solution. This organic phase was poured by fast drop-by-drop into an aqueous phase containing 20 mL of water (Aguettant, Lyon, France) and 15 mL of ethanol (Carlo Erba, France) under mild stirring. Acetone and ethanol were evaporated under low pressure at 32 $^{\circ}\text{C}$ using a rotavapor (Buchi, Rungis, France).

2.3. NP Physicochemical Characterization

Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were performed with a Zeta Sizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Royston, UK) to evaluate the hydrodynamic diameters of plain and vitamin E-loaded NPs and their polydispersity indexes (PDI) after their dilution in a 0.22 μm -filtered 1 mM NaCl solution (Sigma Aldrich, France). The zeta potentials of the particles were estimated by electrophoretic mobility using the same apparatus.

2.4. Quantification of Vitamin E Loading

Vitamin E-loaded NPs were centrifuged for 30 min at 16,896 \times g and supernatants were collected to determine the quantity of non-encapsulated vitamin E. Pellets containing the encapsulated drug were washed twice with water (Aguettant, Lyon, France) and resuspended in HPLC-grade acetonitrile (Carlo Erba, France). Vitamin E was quantified by HPLC (1100 Series, Agilent, CA, USA) with a silica-based reversed-phase column (C18, 5 μm , Merck, Lyon, France) by injecting 40 μL of sample at 25 $^{\circ}\text{C}$. An isocratic method was performed with a mobile phase containing acetonitrile, water and trifluoroacetic acid (Merck, France) in the proportions 99:1:0.1 (*v/v/v*) at 0.8 mL/min. The detection wavelength was fixed at 290 nm and a linear calibration curve was obtained from 1 to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2 = 0.9988$). The loading rate and the encapsulation efficiency were calculated using the following equations:

$$\text{Loading rate} = 100 \times \frac{\text{mass of encapsulated vitamin E}}{\text{mass of PLA}}$$

$$\text{Encapsulation efficiency} = 100 \times \frac{\text{mass of encapsulated vitamin E}}{\text{total mass of vitamin E}}$$

2.5. Molecular Dynamics

DPD simulations were performed using the Materials Studio software (Materials Studio 2017, Biovia, Dassault Systèmes, Lyon, France, 2016). For the water molecules (W), a coarse graining approach was used, in which one bead represents 3 molecules of water. The radius of the water bead was set to 3.23 \AA and its molecular mass to 54 Da. Pam₁CSK₄ molecules were constructed using 5 different types of beads: lysine (K), serine (S), modified cysteine (C), modified glycerol (G) and five C₃H₆ fatty acid units (F). Pam₃CSK₄ molecules were constructed using the same C, S, K and F beads. PLA molecules were constructed as linear repetitions of 70 units of lactic acid monomers (LA)_n. Vitamin E molecules were constructed using 2 different types of beads: one for the chromanol double cycle (CHR), and 3 beads (each composed of 5 carbon atoms) for the fatty acid chain (C5). All the different kinds of beads used for our calculations are summarized in Figure 1.

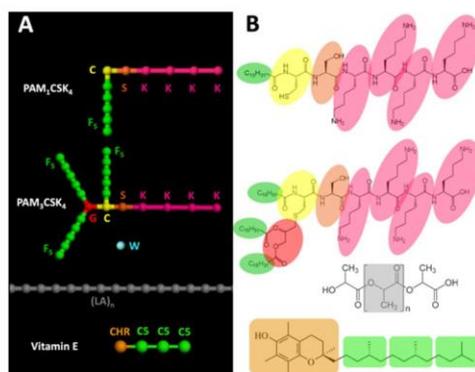


Figure 1. (A) Schematic representation of the 9 different kind of beads used for the dissipative particle dynamics (DPD) calculations. Lysine (K), serine (S), modified cysteine (C), modified glycerol (G) and five C₃H₆ fatty acid units (F) for the Pam₁CSK₄ and the Pam₃CSK₄ molecules; water (W), where one bead represents 3 molecules of water; linear chains of lactic acid monomers (LA)_n for the PLA chains; chromanol (CHR) for the double cycle; and 3 beads (C5) each composed of 5 carbon atoms for the fatty acid chain. (B) Representations of the Pam₁CSK₄, Pam₃CSK₄, water, PLA and vitamin E molecules. The groups of atoms corresponding to the different beads are evidenced using colored backgrounds.

For the calculations, all the solubility parameters δ_i were calculated with the Materials Studio software using either the Synthia module for the beads presented as polymers (LA, F, C5), or models constructed with the Amorphous Cell module for the beads presented as monomers in the simulation. For the models constructed as amorphous cells, all the calculations were performed with the Forcite module using the COMPASS II [51,52] force field for atom parameters and partial charges. After a preliminary geometry optimization phase, a preliminary short equilibration run of dynamics with NVT parameters was performed (500 steps), followed by a longer production run with NVE parameters (5000 steps). The corresponding solubility parameters were then used to calculate the Flory–Huggins interaction parameters χ_{ij} for the corresponding binary mixtures, which were calculated using the relation $\chi_{ij} = (v/RT)(\delta_i - \delta_j)^2$ where R is the gas constant, T the absolute temperature and v is the mean volume per mole of the two corresponding components [47]. The molar volume for each component was determined using the Molecular Operating Environment software (MOE 2017, Chemical Computing Group, Köln, Germany). The Flory–Huggins interaction parameters were then converted into DPD repulsion parameters a_{ij} , which were obtained using the relation $a_{ij} = 25 + 3.50 \times \chi_{ij}$ [46]. All the DPD repulsion parameters used are summarized in Tables 1 and 2.

Table 1. DPD repulsion parameters used for all the simulations involving water, PLA, Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄ molecules.

	G	W	F	C	S	K	LA
G	78						
W	99.4	78					
F	26.1	91.3	78				
C	26.0	82.6	28.5	78			
S	28.9	61.4	31.8	26.1	78		
K	161.3	26.7	157.3	134.6	101.3	78	
LA	25.4	91.3	25.1	27.2	30.3	154.3	78

Table 2. DPD repulsion parameters used for all the simulations involving vitamin E, water and PLA molecules.

	W	CHR	C5	LA
W	78			
CHR	169.6	78		
C5	115.0	25.9	78	
LA	91.3	25.0	25.3	78

For the self-assembly studies of Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄, we used 280 × 280 × 280 Å cubic periodic boxes of water containing randomly distributed molecules of Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄. We used 3%, 10% and 30% concentrations (number of Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄ molecules versus vs. water molecules). After an initial geometry optimization within the Mesocite module, DPD experiments were run using a total simulation time of 10 ns.

For the particle formation, our calculations were performed using 280 × 280 × 280 Å cubic periodic boxes of water as starting points for all the dynamics. Droplets with a radius of 130 Å containing a mixture of water; PLA; and Pam₃CSK₄, Pam₁CSK₄ or vitamin E molecules were placed at their center. In order to mimic the experimental ratio of PLA vs. Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄ molecules during the NP synthesis, we used inside of the 130 Å droplet a mixture ratio of 201 water molecules vs. 67 PLA molecules vs. 1 Pam₃CSK₄ molecule, thereby mimicking a Pam₃CSK₄ concentration of 180 µg/mL and a 4% PLA/water (w/w) ratio. For the vitamin E simulations, we used a ratio of 750 water molecules to 125 PLA chains and 117 vitamin E molecules in order to recreate an 8% w/w ratio for vitamin E vs. the PLA chains. After an initial geometry optimization within the Mesocite module, DPD experiments were conducted using a time scale of 3 ps and various total simulation times, up to 30 ns.

For the Pam₃CSK₄/PLA saturation studies, we used 500 × 100 × 100 Å periodic boxes of water. A layer of PLA chains (with a thickness of 100 Å) was placed at one extremity, and the rest of the box was filled with increasing concentrations of randomly dispersed Pam₃CSK₄ molecules solvated in water. We show our results with three molecular ratios of Pam₃CSK₄ vs. water (number of molecules vs. number of molecules), ranging from 1% to 10%. After an initial geometric optimization within the Mesocite module, DPD experiments were conducted using a time scale of 3 ps and longer simulation times, up to 300 ns.

3. Results

3.1. Behavior of Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄ at Increasing Concentrations

In order to validate our approach and the used simulation parameters, we confronted the molecular behavior of Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄ in a series of experiments, using each molecule separately in an aqueous environment at increasing concentrations, without any PLA molecules. Thus, we performed DPD simulations using the Materials Studio software. This non-atomistic kind of simulation is particularly well-adapted to large systems. We started all of these simulations in 280 Å periodic cubic boxes with randomly distributed molecules mixed with water. After an initial geometric optimization, we started the DPD experiments for a total simulation time of 10 ns, which is a sufficient time to observe the formation of micelles [47], and in this case allows one to reach a stable state.

As shown in Figure 2, at a 3% concentration (number of Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄ molecules vs. number of water molecules), little difference was observed between the two molecules, which tended to auto-assemble and form small micelles surrounded by large clusters of water molecules. Those micelles are characterized by concentrations of the hydrophobic fatty acid chains (in green) at their centers, whereas the more hydrophilic peptidic parts (K residues, in purple) were directly exposed to the water on their outer surfaces. At 10% concentration, Pam₃CSK₄ molecules started to form bigger clusters with more complex internal self-assembly motifs, which look like flattened micelles of some kind, whereas Pam₁CSK₄ molecules remained in regular organized micelles, with the same

hydrophilic/hydrophobic separation of their constitutive parts. Finally, at a 30% concentration, only Pam₃CSK₄ molecules adopted a different type of well-defined multimeric structure, creating extended nanotubes of some kind, along with some more regular spherical micelles, whereas Pam₁CSK₄ molecules remained in regular (though bigger) micelles, with a diameter of around 5 nm.

These structures are extremely reminiscent of those observed in two recent papers. First, the self-assembly of the Pam lipopeptides was examined using a combination of electron microscopy and small-angle X-Ray scattering (SAXS) techniques [48]. Using cryo-transmission electron microscopy (TEM) images, it was shown that Pam₁CSK₄ (and also Pam₂CSK₄) molecules form spherical micelles in concentrated solutions, with a measured diameter of 5 nm, which is in total agreement with our simulations. Furthermore, in a complete contrast, Pam₃CSK₄ molecules form flexible “wormlike micelles coexisting with regular micelles,” which is precisely what was observed at the end of our simulations. The SAXS data indicate a 5.3 nm thickness for the Pam₃CSK₄ bilayers in the wormlike structures, which is excellent agreement with our simulations as well. The cryo-TEM pictures are reproduced in Figure 1 with the agreement of their author.

Moreover, those “flexible flattened wormlike micelles” were also observed using all atomistic molecular dynamic simulations [53] with a smaller (45 to 180) number of Pam₃CSK₄ molecules. The resulting calculated structures are in excellent agreement with our models. This further validates our non-atomistic DPD approach, which gives similar results with shorter computing times, but also allows for the study of larger systems, with more lipopeptides molecules, and with or without the addition of numerous PLA chains.

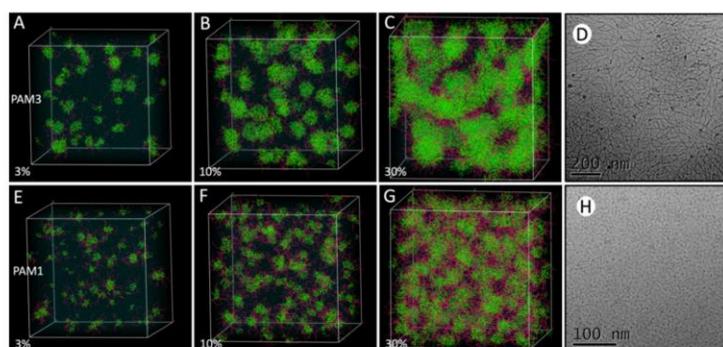


Figure 2. Comparison of DPD simulations for Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄ in 280 Å simulation boxes: (A–C) Pam₃CSK₄ DPD simulation and (E–G) Pam₁CSK₄ DPD simulation. The relative number of Pam molecules vs. the number of water molecules is indicated as follows: (A,E) 3%, (B,F) 10%, (C,G) 30%. PLA and Pam molecules were randomly mixed in the full simulation box. The total DPD simulation time was 10 ns in every case. The results are displayed for each simulation experiment. (D,H) Cryo-TEM images of the self-assembled structures, courtesy of Ian W. Hamley [48].

3.2. Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄ Particle Formation

Different techniques are available for synthesizing PLA-based nano and micro particles: single, double and multiple emulsion methods, precipitation-based methods, direct compositing methods, microfluidic technique and the hydrogel template method [29]. The nanoprecipitation method used in our studies allows for a narrow size distribution and requires a low energy source. Moreover, in contrast to the emulsion-based methods which require the use of surfactants, no additional molecule is added during the nanoprecipitation process described in this study: the molecules of interest are directly entrapped thanks to the hydrophobic properties of the PLA chains, and the water molecules are quickly excluded from the particle core. Less toxic solvents are used, and there are no residual

solvent traces left at the end of the particle formation. Thus, the molecular modeling simulation of such systems does not require the addition of surfactant molecules either.

In order to gain insights into the nanoprecipitation-based particle formation process, we also performed DPD simulations for biologically relevant molecules in interaction with PLA chains. Our DPD simulations allow one to model large systems, in a range of sizes from nm to μm , and are particularly well-adapted to PLA-NP studies. In order to mimic the particle formation process, we used cubic periodic boxes of water measuring $280 \times 280 \times 280 \text{ \AA}$ as starting points for all the dynamics. Droplets with a radius of 130 \AA containing mixtures of water; PLA; and Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄ were placed at their center. The experimental particle formation of PLA NPs with Pam₃CSK₄ has already been previously described. We used a PLA/Pam molecular ratio of 67/1, which perfectly mimics a PLA/water 4% mass ratio and a Pam molecular concentration of $180 \mu\text{g/mL}$. Those are the exact conditions which were used during our laboratory assays for the nanoprecipitation of the particles. After an initial geometry optimization, we started the DPD dynamics and allowed the simulations to run for times up to 30 ns.

For Pam₁CSK₄, the results are essentially the same as those already described for Pam₃CSK₄. In both cases, at the very start of the simulations, we observed that the PLA polymer chains underwent a volume contraction and released all the Pam₃CSK₄ molecules outside of the PLA particle in formation. Starting from a 260 \AA diameter, the final diameter measured for the complete NP was about 150 \AA in each case. Most of the water molecules were rapidly excluded as well. As a result, no Pam₃CSK₄ or Pam₁CSK₄ molecules were found deeply buried inside the PLA particle, as illustrated in Figure 3, and in Videos S1 and S2. The Pam molecules interacted with the PLA chains by their fatty acid chains, while keeping their more hydrophilic parts (mostly the Lys residues) pointing outwards from the particle, directly exposed to the surrounding water. In both cases, the Pam molecules were randomly distributed on the surface and interacted with the PLA chains through their buried fatty acid chains.

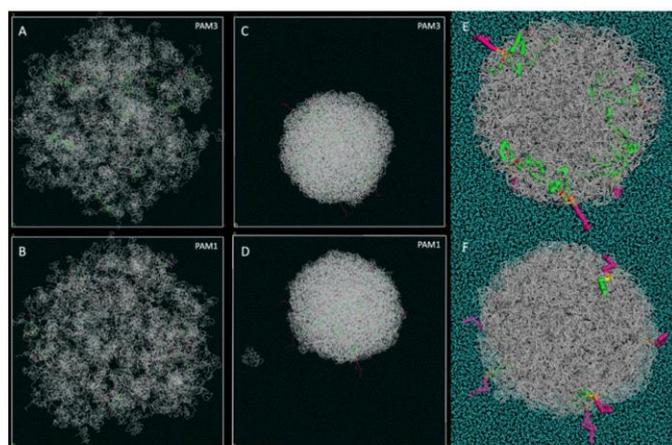


Figure 3. Comparison of DPD simulations for the PLA particle formation with Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄: (A,B) Starting point of the DPD simulation: (A) Pam₃CSK₄, (B) Pam₁CSK₄. Droplets with a radius of 130 \AA containing a mixture of water, PLA and Pam molecules were placed at the center of a water-filled simulation box. (C,D) End of the simulation after 30 ns total simulation time: (C) Pam₃CSK₄, (D) Pam₁CSK₄. Pam₃CSK₄ and Pam₁CSK₄ hydrophilic parts (in magenta) were excluded from the PLA nanoparticle, and the molecules interacted with the PLA surface through their buried fatty acid chains (in green). The scale factor is the same as in (A,B) for better observation of the volume contraction. The whole simulation cell ($280 \times 280 \times 280 \text{ \AA}$) is displayed in A, B, C and D. (E,F) Zoomed-

in cross-section of the particle. The buried fatty acid chains (in green) of either Pam₃CSK₄ (E) or Pam₁CSK₄ (F) are clearly visible inside the spherical core of the particle.

Interestingly, during the simulations, some PLA chains form small clusters, which are independent of the main particle and may or may not encompass some Pam molecules. Some of them are gradually absorbed by the main particle along the way, whereas some remain isolated until the end of the experiments, as shown in Figure 3D. This suggests that the number of PLA chains inside a particle may be somehow limited to a certain number, which is consistent with the fact that the PLA chains form multiple NPs of regular size during the laboratory assays. This also goes along well with the increase of the PdI previously observed [26] upon the formation of Pam₃CSK₄ loaded PLA NPs. In contrast, no Pam₁CSK₄ or Pam₃CSK₄ molecule was found isolated in solution or interacting with PLA chains at the end of each simulation. This is consistent with our Pam₃CSK₄ experimental encapsulation results where we previously demonstrated a 99% entrapment efficiency [26].

3.3. Pam₃CSK₄/PLA Saturation Studies

Despite providing satisfactory models for the Pam/PLA particle formation process, our results show only a small number of lipopeptides molecules being incorporated into the PLA NPs. This is mainly due to the size of our simulated systems, which remained smaller than the real-life particles observed in our laboratory. However, as it seemed that we were very far from the saturation of the PLA NPs with lipopeptides molecules, we tried to increase their number and see how many our simulations would allow us to incorporate within a PLA layer of a given size.

In this regard, we used $500 \times 100 \times 100$ Å periodic boxes of water filled with a 100 Å PLA layer at one extremity, and with randomly dispersed molecules of Pam₃CSK₄ at different concentrations, as illustrated in Figure 4. It should be noted that the PLA layer is thick enough so that molecules of Pam₃CSK₄ located on each side of the surface cannot interact together through their buried fatty acid chains. After an initial geometry optimization, we performed DPD experiments in order to observe the diffusion of the lipopeptides molecules and their incorporation into the PLA layer. We used longer simulation times (up to 300 ns) in order to allow for homogenous repartition of the molecules inside the simulation box.

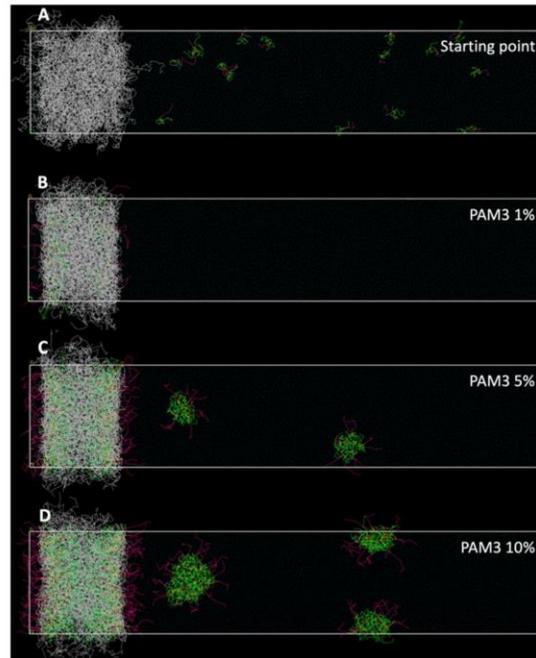


Figure 4. Comparison of DPD simulations for the Pam₃CSK₄/PLA saturation studies: (A) Starting point of the simulations: the PLA layer is still relaxed and the Pam₃CSK₄ molecules are randomly distributed inside the simulation box. (B–D) End of the simulations after 300 ns of simulation, with increasing concentrations of Pam₃CSK₄ molecules.

Results are presented with three different concentrations of lipopeptides (number of Pam₃CSK₄ molecules vs. number of water molecules), 1%, 5% and 10%. Interestingly, at 1%, all the Pam₃CSK₄ molecules end up located at the surface of the PLA layer. A comparison with the previous results of Figure 3 confirms that a higher density of Pam₃CSK₄ molecules could be well obtained. At the concentration of 5%, more lipopeptides molecules are located at the surface of the PLA layer, but some of them start to form small regular spherical micelles similar to the ones observed in Figure 2. At this point, a close analysis reveals that 75% of the Pam₃CSK₄ molecules are located inside the PLA layer, whereas 25% form micelles away from the PLA layer.

At the 10% concentration, the number of Pam₃CSK₄ molecules located at the surface of the PLA layer is even greater than in the previous 5% experiment. However, as the Pam₃CSK₄ saturation of the PLA layer increases, it should be noted that the proportion of Pam₃CSK₄ molecules located within the PLA layer decreases in regard to the total number of Pam₃CSK₄ molecules involved in the simulation. We can see that only 60% of the total Pam₃CSK₄ molecules of the simulation were located inside the PLA layer, whereas 40% were present in the surrounding micelles.

These results evidence that there is some kind of competition between the PLA layer and the formation of micelles for the incorporation of Pam₃CSK₄ molecules. At first the PLA layer seems to demonstrate a better affinity for the lipopeptide molecules. Then, with the gradual saturation of the PLA chains, the residual molecules tend to start forming micelles. This observation is in clear agreement with our previous laboratory assays, where we demonstrated that the vectorization of lipopeptides such as Pam₃CSK₄ was possible even at concentrations above their critical aggregation concentration (CAC) [26].

3.4. Vitamin E Encapsulation

To balance the studies of lipopeptides presented in this article, we wanted to extend our simulation models to other molecules with radically different properties. The main characteristic of lipopeptides accounting for their behavior with respect to PLA chains is their amphiphilic property, which allows them to be located at the surfaces of PLA NPs, with their hydrophobic lipidic extremities buried inside the particle and their hydrophilic peptidic extremities pointing towards the surrounding water. To challenge our simulation parameters and further validate our DPD approach, we started the study of a highly hydrophobic molecule—vitamin E. This was meant to allow us to develop and validate our DPD modeling approach presented in this study, by comparing the results for molecules with drastically different properties, and thus validate our simulation parameters and protocols. In this regard, we studied the entrapment of vitamin E molecules within PLA NPs, in both *in vitro* and DPD simulations, and then confronted the laboratory assays with the simulation results.

PLA NPs were produced by nanoprecipitation using increasing concentrations of vitamin E, followed by an evaluation of their colloidal characteristics and the encapsulation efficiency. The hydrodynamic diameter of plain NPs measured by DLS was equal to 190 nm and their Pdl of 0.05 pointed out a narrow size distribution (Figure 5). We observed that the colloidal properties of the PLA NPs were impacted upon their loading with vitamin E. The hydrodynamic diameter increased up to 220 nm and their size distribution was more heterogeneous with a Pdl reaching 0.12. The encapsulation efficiency, evaluated by HPLC, was around 85% and remained unchanged at loading rates ranging from 1.2% to 10%. Both the plain and the vitamin E-loaded NPs conserved a zeta potential estimated by electrophoretic mobility close to -60 mV, and the suspensions were stable for at least two months at 4 and 37 °C (data not shown).

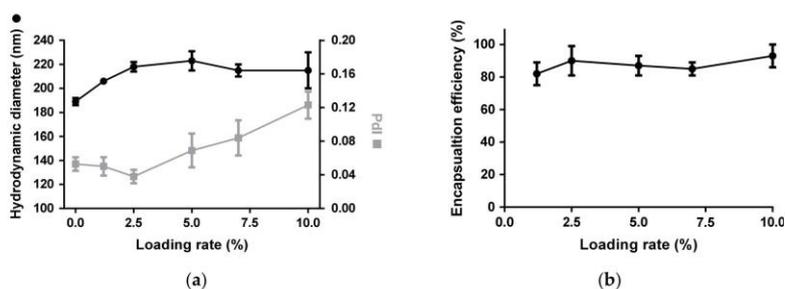


Figure 5. (a) Physicochemical characteristics (hydrodynamic diameter and Pdl) and (b) encapsulation efficiency of vitamin E-loaded PLA NPs for increasing loading rates. Values are means \pm standard deviations of four measurements for one representative experiment.

To better understand the experimental results obtained with vitamin E, we performed DPD experiments in order to evaluate its ability to be encapsulated within PLA NPs. As vitamin E is a much more hydrophobic molecule than the previously used lipopeptides, we expected it to be fully buried inside the PLA NPs. We used several PLA to vitamin E weight to weight ratios (loading rates) starting from 0.5% and going up to 8% in order to explore different options. The results shown here were obtained with an 8% *w/w* ratio for vitamin E vs. the PLA chains, which is close to the maximum tested during the *in vitro* experiments. After an initial geometry optimization, DPD experiments were run using a total simulation time of 30 ns. The results of our DPD experiments are shown in Figure 6 and illustrated in Video S3.

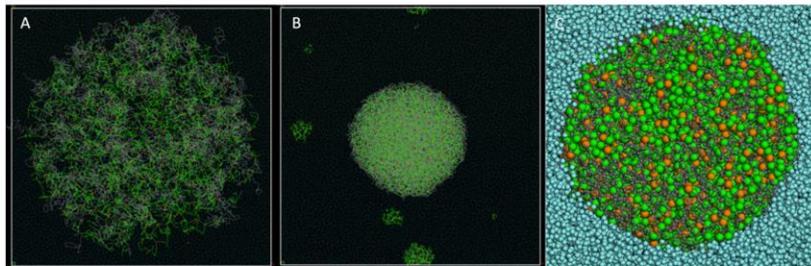


Figure 6. DPD simulation for the PLA particle formation with vitamin E: (A) Starting point of the DPD simulation. A droplet with a radius of 130 Å containing a mixture of water, PLA and vitamin E molecules (8% loading rate) is placed at the center of a water-filled simulation box. (B) End of the simulation after 30 ns total simulation time. The vitamin E molecule is totally dispersed within the PLA chains, from the surface to the core of the particle. The scale factor is the same as in (A) for better observation of the volume contraction. The whole simulation cell ($280 \times 280 \times 280$ Å) is displayed in A and B. (C) Zoomed-in cross-section of the particle. The water molecules are totally excluded from the hydrophobic core formed by the intricate PLA chains and the vitamin E molecules.

During the fast particle formation, all the water molecules were excluded from the hydrophobic core of the particle. We also observed a volume contraction, from a 260 Å diameter at the beginning to about 140 Å after 30 ns of simulation time. During the particle formation simulations, some PLA chains along with some vitamin E molecules assembled and formed small independent clusters. Most of them were absorbed by the central particle during the few first ns of the DPD calculations (as illustrated in Video S3), but some clusters of isolated vitamin E remained either associated with a few PLA chains, or stayed by themselves. Then the simulation reached a stable state, with some small molecular clusters remaining isolated even after 30 ns of simulation.

These results go well along with our laboratory experiments, where the vitamin E encapsulation efficiency was demonstrated to be about 85% at similar loading rates (Figure 5b), meaning that about 15% of the vitamin E molecules are not encapsulated into PLA NPs and are free to form some small independent clusters. Interestingly, this contrasts with what was observed with the Pam₃CSK₄ or Pam₃CSK₄ molecules were observed at the ends of the molecular simulations. Either way, in the case of a total entrapment efficiency or not, our modeled systems account for this experimental parameter.

The observation of these little clusters of vitamin E or vitamin E and PLA chains also agrees with the experimental observation of the PdI of the particles, which increases upon vitamin E loading (Figure 5a). This also suggests that there is a form of competition between the PLA chains and the isolated vitamin E and PLA clusters to incorporate the remaining supplemental vitamin E molecules.

The stability of the simulation also goes well along with our experimental observation that the vitamin E-loaded particles remained stable for at least two months at 4 and 37 °C. Finally, the diameter size increase of the particles (Figure 5a) upon vitamin E loading was observed in our simulations as well, where the added molecules of vitamin E contributed to forming bigger NPs, as compared to simulations with PLA chains only.

4. Discussion

In this article, we provided some mechanistic explanations for the rearrangement of the ligands during the nanoprecipitation process. We based our study on two sets of molecules exhibiting very different physicochemical profiles: vitamin E, and TLR agonists Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄. We used DPD simulations in conjunction with biochemical experiments in order to study the nanoprecipitation process by proving that, although Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄ molecules tend to respectively form either micelles or wormlike particles in concentrated solutions, they both end up located on the surfaces of the PLA NPs upon their formation. On the other hand, vitamin E molecules

are buried deeper at the core of the particle when mixed with PLA due to their hydrophobic properties.

These results, which are extremely consistent both with the previous studies describing the NP formation and with our experimental studies, tend to underline the two following aspects: (1) The NP/molecule assembly depends on their respective concentrations and physicochemical profiles. This can provide us with a better understanding of the molecular mechanisms at stake and help us to predict the encapsulation profiles of other molecules based on their physicochemical properties. (2) The DPD approach that we chose in order to model the nanoprecipitation process proved to successfully describe the molecular behavior of self-assembling lipopeptides in micelles or in flattened wormlike micelles, but also the behavior of self-assembling PLA chains interacting with hydrophobic and amphiphilic molecules. Our results also indicate that DPD can be used for systems encompassing different bead sizes. Indeed, whilst DPD theory suggests that you could have beads with different masses in your simulated system, there has been so far little validation on the effect of this. This was achieved in our case without affecting the quality of the prediction, with the molecular weight of the different beads ranging from 42 Da for the F bead of Pam:CSK4 and Pam:CSK4 to 219 Da for the CHR bead of vitamin E, as illustrated in Figure 1. Moreover, the DPD method, which was originally developed mostly for polymers, gave satisfactory results here, even with small molecules such as vitamin E simulated with only two different beads, and only four in total (one CHR and three C5 beads), whereas our PLA chains were 70 LA monomers long.

However, despite the very good agreement between our experimental observations and our simulations, some points related to our modeling strategy have to be addressed. In particular, as in most molecular dynamics methods, we rather underestimated the number of water molecules in our simulations, resulting in a much more concentrated medium than the reality. We modified these parameters, because strict compliance in our simulations with the concentrations involved in vitro was nearly impossible to achieve using a realistic computing power. However, even if the number of water molecules was greatly underestimated, our ratios between LA monomers and lipopeptides molecules or between LA monomers and vitamin E molecules exactly match the reality of the in vitro experiments. Besides, reproducing the exact concentration would not provide supplementary information since the interactions between the NPs and the substrates mainly depend on short distance interactions. Adding more water molecules would just dilute the relevant molecules but would not change the nature of the molecular interactions responsible for the micelle or the particle formation. Thus, by reducing the number of modeled water molecules, we did not change the dynamics of the interactions, but we optimized our calculations in terms of power. However, it also should be noted that limiting the number of water molecules, and thus working in a more concentrated medium, enhances the attraction/repulsion behavior of the different molecules present in the system. This leads to quite a segregationist model where the hydrophobic/hydrophilic interactions are somehow overestimated. This might enhance the encapsulation behavior, which happens extremely fast in our simulations. Additionally, this simplified model is not really suited to describe long and complex processes such as the release of molecules from the PLA NPs. DPD simulations can typically describe molecular evolutions in the timescale of μ s or at best ms (such as the encapsulation process), but release is a totally different process which occurs within hours or days. This is another inherent limitation of our method. In this regard, all atomistic simulations of the diffusion of an encapsulated molecule within a PLA NP could provide useful insights into the release process.

The size of our simulations is another point to be discussed. For the formation of the micelles and the wormlike micelles (280 Å periodic cubic boxes), this size is sufficient to observe the formation of self-assembling nanostructures exhibiting the exact same size as experimentally observed in the cryo-TEM images, namely, 5 nm in diameter for the of Pam:CSK4 micelles and slightly more for the thickness of the Pam:CSK4 bilayers found in the wormlike micelles.

On the other hand, in order to limit the computing power needed, our simulated PLA NPs were roughly scaled to 1/10 relatively to the real size of the PLA NPs produced and analyzed in our laboratory. In an attempt at consistency, as explained in the Materials and Methods section, we also

used PLA chains about 10 times shorter: those were 70-mer chains in all our simulations, whereas the real length of the polymeric chains we used in the laboratory was more like 700 units of monomeric lactic acid. That did not much effect the outcome of the vitamin E particle formation experiments: one can expect to observe particles 10 times bigger, still with PLA chains mixed to an equivalent amount of vitamin E. The situation is a bit more complex with molecules such as Pam:CSK₄ and Pam:CSK₄, as these molecules are exclusively located at the surface of the particle at the end of every simulation. A 10 times bigger particle in radius (or diameter) would have a volume 1000 times bigger, but a surface only 100 times as large. By keeping the same PLA/Pam molecules ratio, this would mean that the simulation should account for 1000 times more PLA monomers, 1000 times more Pam molecules, but only a peripheral surface 100 times larger, which would increase the surface concentration of our particles. Our particle formation experiments (Figure 3) actually show that the PLA surface is far from completely saturated by Pam:CSK₄ molecules. The actual formation process of a 10 times larger particle would obviously lead to a much higher density of Pam:CSK₄ molecules at the surface of the particle. Our simulated models, however, are in good agreement with this observation, as this was later investigated with the saturation experiments (Figure 4). This figure highlights the fact that our simulated particles could accommodate for much more Pam:CSK₄ or Pam:CSK₄ molecules on their surfaces than illustrated in Figure 3.

Another discussion topic involves the duration of our simulations. Even though the formation times of our Pam:CSK₄ micelles are in agreement with the DPD observations of Groot and Rabone for similar systems [47], the timescale we observed for a complete NP formation (a few ns) may be considered extremely short. The smaller size of our particles may provide some kind of explanation, but really, it is important to mention that in DPD simulations, the characteristic times and lengths of the solvent molecules are inferior to the ones of the polymer molecules by several orders of magnitude. In this regard, DPD simulations rely more on hydrodynamic considerations than Newtonian molecular dynamics. Thus, classical molecular dynamics would require time steps derived from the solvent properties, and therefore would involve extremely long simulation times to observe some major conformational changes in the organization of the polymer molecules.

The goal behind these strictly controlled adjustments is to optimize the simulation parameters and to observe the PLA NP encapsulation process in a reasonable amount of computing time. As a result, it is important to notice that timescales of a DPD simulation are not transposable to the ones observed in the context of an experimental approach, or even in a classical Newtonian molecular dynamics experiment. On a side note, it is important to mention that none of the calculations presented in this study exceeded 50 h in total simulation time, running on 40 out of an 80 processors computer, which highlights the computing efficiency of the method.

Finally, although Meunier et al. considered DPD methods less efficient than fully atomistic simulations for the estimation of the loading capacity of substrates on PLA-PEG NPs [40], we propose here a more nuanced point of view: DPD may not be as accurate as all atomistic simulations in a number of applications. However, in the context of this study, DPD perfectly matches all atomistic simulations [53] and experimental results obtained in our laboratory [26] or elsewhere [48]. Thus, we conclude that DPD, despite its inherent simplifications, represents a fast and practical method for the molecular simulation of large systems over long periods of simulation time, with a great computing efficiency. In particular, DPD can be used as a powerful simulation method to simulate the nanoprecipitation process involved in the PLA NP formation, and can help us to predict the encapsulation profile of other molecules based on their physicochemical properties.

5. Conclusions

In this study, we investigated the behavior of different molecules interacting with self-assembling PLA NPs, using both biochemistry approaches and molecular modeling tools. We confronted our calculations with the experimental data obtained in our laboratory, but we also took into account experimental results from other laboratories, namely, the cryo-TEM pictures provided with the consent of their authors. Our simulation results are in excellent agreement with all these experimental observations. In this regard, our work demonstrates that DPD mesoscopic simulations allow for the accurate and efficient modeling of complex systems such as NPs interacting with small molecules of biological interest.

In particular, we demonstrated that our simulated systems were able to account for the following experimental facts: (1) Pam₁CSK₄ and Pam₃CSK₄ molecules in concentrated solutions and in absence of any other molecules adopt the same behavior as what is observed in cryo-TEM experiments: Pam₁CSK₄ molecules form spherical micelles with a measured diameter of 5 nm, whereas in contrast, Pam₃CSK₄ molecules form flexible “flattened wormlike micelles coexisting with regular micelles”. (2) PLA chains auto-assemble into hydrophobic NPs in an independent process during which the vast majority of the water molecules present at the beginning of the simulation are quickly excluded from the particle core in formation. (3) Our simulated systems give very different results for molecules with very different biochemical properties: Even though both hydrophobic and amphiphilic molecules associate with the newly formed PLA NPs, they interact in a very different manner. Hydrophobic molecules such as vitamin E are buried deeply at the cores of the particles, completely mixed and intertwined with the PLA chains, whereas amphiphilic molecules such as the Pam lipopeptides only interact with the PLA chains through their hydrophobic moiety, and keep their hydrophilic constituents at the surface of the particle, free to interact with the surrounding water molecules.

This work highlights the added value of a PLA NP-based delivery system for both amphiphilic and hydrophobic molecules, such as the Pam lipopeptides and the vitamin E molecule. A very good control could be added with the study of a completely hydrophilic molecule or small chain macromolecule to validate the extreme ends of this case study—both amphiphilic to hydrophobic. Some experimental work in this direction has already been performed in our laboratory. As expected, we observed an extremely limited encapsulation efficiency and most of the hydrophilic molecules remain in the surrounding water. Of course, in this case, we highly suspect that the few encapsulated molecules end up located at the surface of the PLA NPs and are not buried inside. A DPD study of the interaction of PLA NPs with such molecules would be a very good follow up to our work and will probably be started in the near future.

Pam delivery nano-systems could very well be used for immunotherapies in a near future, whereas systems such as PLA NP-based vitamin E carriers are promising models for new drug and antibiotic delivery systems. Furthermore, PLA polymer offers the advantage of being less toxic than inorganic polymers. Our results indicate that this method should be applicable to similar amphiphilic molecules and more generally to hydrophobic molecules. This approach could also be used for vaccination purposes, as the encapsulation of immune modulators [20] could facilitate the antigen presenting cell stimulation by protecting the molecule of interest and thus potentializing its activity.

As a result, our mesoscopic DPD experiments can help to bring some mechanistic explanations to the formation process of the PLA NPs and to their interactions with a variety of biological molecules. In particular, this allows us to better describe the behavior of these molecules during the nanoprecipitation process, and then to better understand their biological properties. Our work illustrates that DPD can be used as a molecular modeling tool of choice for further applications in various fields, such as drug delivery, immunotherapy, vaccines and cancer treatment. Our results can be used to better understand the nature of drug-polymer interactions, which could lead to the development of better delivery systems in the near future.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2079-4991/10/11/2209/s1, Video S1: Formation of a PLA NP in presence of Pam:CSK₄. Video S2: Formation of a PLA NP in presence of Pam:CSK₄. Video S3: Formation of a PLA NP in presence of vitamin E. Videos S1 and S2 show the formation of PLA NPs in the presence of Pam:CSK₄ and Pam:CSK₄ molecules, respectively, with an equivalent Pam molecule concentration of 180 µg/mL. Video S3 shows the particle formation in the presence of vitamin E at an 8% vitamin E/PLA (mass/mass) ratio. The three videos show the first 6 ns out of 30 ns DPD experiments. This time may seem short but is sufficient to observe most of the full particle formation process. Interestingly, during the first 6 ns, some PLA chains form small clusters, which are independent of the main particle and may or may not encompass Pam or vitamin E molecules. Some of them are gradually absorbed by the main particle along the way, whereas some remain until the end of the video. During the following 24 ns, most of them are definitely absorbed as well, but some are still visible, as shown in Figures 3 and 6.

Author Contributions: Conceptualization, S.M., S.A., M.L. and D.D.C.; methodology, S.M., M.L., M.B. and D.D.C.; software, S.M.; validation, S.M. and S.A.; resources, S.A.; data curation, S.A.; writing—original draft preparation, S.M., S.A., M.L. and D.D.C.; writing—review and editing, C.P., R.T. and B.V.; supervision, C.P., R.T. and B.V.; project administration, C.P., R.T. and B.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received financial support from the ANR, France (Agence Nationale de la Recherche) with the research program ANR-20-COVI-000/CovidNanoMed to BV and ML, and ANRS funding to BV (ECTZ 62760). MB got a PhD funding from DGA (Direction Générale de l'Armement, France). DCC got a PhD funding from ANRT through a Cifre convention.

Acknowledgments: The authors would like to thank Britany Guillaumin and Stéphanie Malnuit from LBTI IBCP for their work on the vitamin E loading and characterization with the NPs. The authors also would like to thank Professor Ian W. Hamley for the use of his cryo-TEM pictures.

Conflicts of Interest: The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: B.V. declares financial interests in Adjuvatis.

References

- Peng, Q.; Mu, H. The potential of protein–nanomaterial interaction for advanced drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 121–132.
- Dufort, S.; Sancey, L.; Coll, J.-L. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 179–189, doi:10.1016/j.addr.2011.09.009.
- Rawat, P.; Manglani, K.; Gupta, S.; Kalam, A.; Vohora, D.; Ahmad, F.J.; Talegaonkar, S. Design and Development of Bioceramic Based Functionalized PLGA Nanoparticles of Risedronate for Bone Targeting: In-vitro Characterization and Pharmacodynamic Evaluation. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 3149–3158, doi:10.1007/s11095-015-1692-4.
- Gao, J.; Zheng, Y.; Jehng, J.-M.; Tang, Y.; Wachs, I.E.; Podkolzin, S.G. Identification of molybdenum oxide nanostructures on zeolites for natural gas conversion. *Science* **2015**, *348*, 686–690, doi:10.1126/science.aaa7048.
- Davis, M.E.; Chen, Z.; Shin, D.M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771–782, doi:10.1038/nrd2614.
- Jokerst, J.V.; Lobovkina, T.; Zare, R.N.; Gambhir, S.S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 715–728.
- Maggi, L.; Bruni, G.; Maietta, M.; Canobbio, A.; Cardini, A.; Conte, U.I. Technological approaches to improve the dissolution behavior of nateglinide, a lipophilic insoluble drug: Nanoparticles and co-mixing. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 562–567.
- Petschauer, J.S.; Madden, A.J.; Kirschbrown, W.P.; Song, G.; Zamboni, W.C. The effects of nanoparticle drug loading on the pharmacokinetics of anticancer agents. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 447–463, doi:10.2217/nnm.14.179.
- Abouelmagd, S.A.; Sun, B.; Chang, A.C.; Ku, Y.J.; Yeo, Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 997–1003.
- Dube, A.; Nicolazzo, J.A.; Larson, I. Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (–)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *44*, 422–426.

11. Tian, Y.; Shi, C.; Sun, Y.; Zhu, C.; Sun, C.C.; Mao, S. Designing Micellar Nanocarriers with Improved Drug Loading and Stability Based on Solubility Parameter. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 816–825, doi:10.1021/mp5006504.
12. Morales, J.O.; Valdés, K.; Morales, J.; Oyarzun-Ampuero, F. Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 253–269.
13. Peng, Q.; Zhang, Z.-R.; Gong, T.; Chen, G.-Q.; Sun, X. A rapid-acting, long-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBHHx nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1583–1588.
14. Peng, Q.; Sun, X.; Gong, T.; Wu, C.-Y.; Zhang, T.; Tan, J.; Zhang, Z.-R. Injectable and biodegradable thermosensitive hydrogels loaded with PHBHHx nanoparticles for the sustained and controlled release of insulin. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5063–5069, doi:10.1016/j.actbio.2012.09.034.
15. Mauro, P.P.D.; Borrós, S. Development of High Drug Loaded and Customizing Novel Nanoparticles for Modulated and Controlled Release of Paclitaxel. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 3461–3477, doi:10.1007/s11095-014-1434-z.
16. Varga, N.; Benkő, M.; Sebők, D.; Dékány, I. BSA/polyelectrolyte core–shell nanoparticles for controlled release of encapsulated ibuprofen. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *123*, 616–622.
17. Joshi, G.; Kumar, A.; Sawant, K. Enhanced bioavailability and intestinal uptake of Gemcitabine HCl loaded PLGA nanoparticles after oral delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *60*, 80–89.
18. Wei, Y.; Li, L.; Xi, Y.; Qian, S.; Gao, Y.; Zhang, J. Sustained release and enhanced bioavailability of injectable scutellarin-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2014**, *476*, 142–148, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.038.
19. Borkar, N.; Xia, D.; Holm, R.; Gan, Y.; Müllertz, A.; Yang, M.; Mu, H. Investigating the correlation between in vivo absorption and in vitro release of fenofibrate from lipid matrix particles in biorelevant medium. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *51*, 204–210.
20. Gutjahr, A.; Phelip, C.; Coolen, A.-L.; Monge, C.; Boisgard, A.-S.; Paul, S.; Verrier, B. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines* **2016**, *4*, 34.
21. Ce, A.; Cm, S. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247–289.
22. Mahapatro, A.; Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed In-Vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 1–11.
23. Zhao, L.; Seth, A.; Wibowo, N.; Zhao, C.-X.; Mitter, N.; Yu, C.; Middelberg, A.P.J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* **2014**, *32*, 327–337, doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
24. Joshi, V.B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J.* **2013**, *15*, 85.
25. Primard, C.; Rochereau, N.; Luciani, E.; Genin, C.; Delair, T.; Paul, S.; Verrier, B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6060–6068.
26. Lamrayah, M.; Charriaud, F.; Hu, S.; Megy, S.; Terreux, R.; Verrier, B. Molecular modelling of TLR agonist Pam3CSK4 entrapment in PLA nanoparticles as a tool to explain loading efficiency and functionality. *Int. J. Pharm.* **2019**, *568*, 118569.
27. Westwood, A.; Elvin, S.J.; Healey, G.D.; Williamson, E.D.; Eyles, J.E. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* **2006**, *24*, 1736–1743.
28. Kanchan, V.; Panda, A.K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5344–5357.
29. Hajleh, M.N.A.; AL-Samydai, A.; Al-Dujaili, E.A.S. Nano, micro particulate and cosmetic delivery systems of polylactic acid: A mini review. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, doi:10.1111/jocd.13696.
30. Fenton, O.S.; Olafson, K.N.; Pillai, P.S.; Mitchell, M.J.; Langer, R. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705328.
31. Chang, C.-I.; Lee, W.-J.; Young, T.-F.; Ju, S.-P.; Chang, C.-W.; Chen, H.-L.; Chang, J.-G. Adsorption mechanism of water molecules surrounding Au nanoparticles of different sizes. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 154703.
32. Ju, S.-P. A molecular dynamics simulation of the adsorption of water molecules surrounding an Au nanoparticle. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 094718.

33. Weiss, D.R.; Raschke, T.M.; Levitt, M. How hydrophobic buckminsterfullerene affects surrounding water structure. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2981–2990.
34. Chiu, C.; Moore, P.B.; Shinoda, W.; Nielsen, S.O. Size-dependent hydrophobic to hydrophilic transition for nanoparticles: A molecular dynamics study. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 244706, doi:10.1063/1.3276915.
35. Li, L.; Bedrov, D.; Smith, G.D. Water-Induced Interactions between Carbon Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 10509–10513.
36. Brancolini, G.; Kokh, D.B.; Calzolari, L.; Wade, R.C.; Corni, S. Docking of Ubiquitin to Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9863–9878.
37. Verde, A.V.; Acres, J.M.; Maranas, J.K. Investigating the Specificity of Peptide Adsorption on Gold Using Molecular Dynamics Simulations. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2118–2128.
38. Ding, F.; Radic, S.; Chen, R.; Chen, P.; Geitner, N.K.; Brown, J.M.; Ke, P.C. Direct observation of a single nanoparticle–ubiquitin corona formation. *Nanoscale* **2013**, *5*, 9162–9169.
39. Sun, X.; Feng, Z.; Zhang, L.; Hou, T.; Li, Y. The Selective Interaction between Silica Nanoparticles and Enzymes from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107696.
40. Meunier, M.; Goupil, A.; Lienard, P. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2017**, *526*, 157–166.
41. Hoogerbrugge, P.J.; Koelman, J.M.V.A. Simulating Microscopic Hydrodynamic Phenomena with Dissipative Particle Dynamics. *EPL* **1992**, *19*, 155–160.
42. Koelman, J.M.V.A.; Hoogerbrugge, P.J. Dynamic Simulations of Hard-Sphere Suspensions under Steady Shear. *EPL* **1993**, *21*, 363.
43. Kong, Y.; Manke, C.W.; Madden, W.G.; Schlijper, A.G. Simulation of a confined polymer in solution using the dissipative particle dynamics method. *Int. J.* **1994**, *15*, 1093–1101.
44. Schlijper, A.G.; Hoogerbrugge, P.J.; Manke, C.W. Computer simulation of dilute polymer solutions with the dissipative particle dynamics method. *J. Rheol.* **1995**, *39*, 567–579.
45. Español, P.; Warren, P. Statistical Mechanics of Dissipative Particle Dynamics. *EPL* **1995**, *30*, 191–196.
46. Groot, R.D.; Warren, P.B. Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 4423–4435.
47. Groot, R.D.; Rabone, K.L. Mesoscopic Simulation of Cell Membrane Damage, Morphology Change and Rupture by Nonionic Surfactants. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 725–736.
48. Hamley, I.W.; Kirkham, S.; Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Reza, M.; Ruokolainen, J. Toll-like receptor agonist lipopeptides self-assemble into distinct nanostructures. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15948–15951.
49. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4.
50. Vert, M.; Coudane, J.; Schwach, G.; Huet, O.J. Catalyseur et Composition Catalytique Pour la Fabrication d'un Polymere Biocompatible Resorbable, et Procèdes les Mettant en Œuvre. *FR2745005A1*, 11 November 1996.
51. Sun, H. Compass: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7338–7364.
52. Sun, H.; Jin, Z.; Yang, C.; Akkermans, R.L.C.; Robertson, S.H.; Spensley, N.A.; Miller, S.; Todd, S.M. COMPASS II: Extended coverage for polymer and drug-like molecule databases. *J. Mol. Model* **2016**, *22*, 1–10.
53. Zhao, L.; Tu, Y.; Fang, H.; Hamley, I.W.; Wang, Z. Self-Assembled Micellar Structures of Lipopeptides with Variable Number of Attached Lipid Chains Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 9605–9961.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 510–543 (2014).
2. Davies, J. Microbes have the last word. *EMBO reports* **8**, 616–621 (2007).
3. Porter, J. R. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev* **40**, 260–269 (1976).
4. van Miert, A. S. The sulfonamide-diaminopyrimidine story. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **17**, 309–316 (1994).
5. Gottfried, J. History Repeating? Avoiding a Return to the Pre-Antibiotic Age. <https://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/8889467/Gottfried05.html?sequence=2&isAllowed=y> (2005).
6. Armstrong, G. L., Conn, L. A. & Pinner, R. W. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA* **281**, 61–66 (1999).
7. Davies, J. Vicious Circles: Looking Back on Resistance Plasmids. 4.
8. O'Toole, G. A. Classic Spotlight: Before They Were Biofilms. *J Bacteriol* **198**, 5 (2015).
9. Costa-Orlandi, C. B. *et al.* Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *J Fungi (Basel)* **3**, (2017).
10. Høiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* **125**, 272–275 (2017).
11. McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J. & Costerton, J. W. Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* **27**, 910–917 (1981).
12. Costerton, J. W., Irvin, R. T. & Cheng, K. J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 299–324 (1981).
13. Garrison, A. T. & Huigens Iii, R. W. Eradicating Bacterial Biofilms with Natural Products and Their Inspired Analogues that Operate Through Unique Mechanisms. *Curr Top Med Chem* (2016).
14. Hentzer, M., Eberl, L. & Givskov, M. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms* **2**, 37–61 (2005).
15. Lebeaux, D. & Ghigo, J.-M. Infections associées aux biofilms - Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Med Sci (Paris)* **28**, 727–739 (2012).

16. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998).
17. Gottenbos, B., Grijpma, D. W., van der Mei, H. C., Feijen, J. & Busscher, H. J. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* **48**, 7–13 (2001).
18. Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J. & Zehnder, A. J. B. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **4**, 5–22 (1995).
19. Mazumder, S., Falkinham, J. O., Dietrich, A. M. & Puri, I. K. Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation. *Biofouling* **26**, 333–339 (2010).
20. Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. & Höök, M. Mscramm-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annual Review of Microbiology* **48**, 585–617 (1994).
21. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 207–228 (2008).
22. Gill, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J Bacteriol* **187**, 2426–2438 (2005).
23. Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. & Götz, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular Microbiology* **24**, 1013–1024 (1997).
24. Sauer, M. M. *et al.* Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nature Communications* **7**, 10738 (2016).
25. Li, Y., Han, W., Lei, L., Li, Z. & Shi, L. [MrkD adhesin of *Klebsiella pneumoniae* expression, purification and analysis of adhesive activity]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**, 638–642 (2009).
26. Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
27. Okshevsky, M. & Meyer, R. L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 341–352 (2015).
28. Rabin, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem* **7**, 493–512 (2015).

29. Kaplan, H. B. & Greenberg, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**, 1210–1214 (1985).
30. Ganesh, P. S. & Rai, V. R. Alternative Strategies to Regulate Quorum Sensing and Biofilm Formation of Pathogenic *Pseudomonas* by Quorum Sensing Inhibitors of Diverse Origins. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-9026-4_3 (2018).
31. Vitse, J. & Devreese, B. The Contribution of Membrane Vesicles to Bacterial Pathogenicity in Cystic Fibrosis Infections and Healthcare Associated Pneumonia. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
32. Kulp, A. & Kuehn, M. J. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**, 163–184 (2010).
33. Li, Y.-H. & Tian, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* **12**, 2519–2538 (2012).
34. Wilking, J. N. *et al.* Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *PNAS* **110**, 848–852 (2013).
35. Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J. & Stookey, D. The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. *Water Sci. Technol.* **55**, 429–436 (2007).
36. Delaquis, P. J., Caldwell, D. E., Lawrence, J. R. & McCurdy, A. R. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microb. Ecol.* **18**, 199–210 (1989).
37. Saur, T. Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature. (Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014).
38. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209 (2002).
39. Mann, E. E. *et al.* Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLoS One* **4**, (2009).
40. Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2355–2359 (1994).
41. Pecharki, D., Petersen, F. C. & Scheie, A. A. Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**, 932–938 (2008).

42. Kaplan, J. B., Rangunath, C., Ramasubbu, N. & Fine, D. H. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous β -Hexosaminidase Activity. *J Bacteriol* **185**, 4693–4698 (2003).
43. Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**, 1210–1223 (2005).
44. Schwartz, K., Syed, A. K., Stephenson, R. E., Rickard, A. H. & Boles, B. R. Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens* **8**, e1002744 (2012).
45. Tsompanidou, E. *et al.* Requirement of the agr Locus for Colony Spreading of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **193**, 1267–1272 (2011).
46. Sauer, K. *et al.* Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol* **186**, 7312–7326 (2004).
47. Bjarnsholt, T. *et al.* The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* **21**, 466–474 (2013).
48. Zhang, T. C. & Bishop, P. L. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research* **28**, 2267–2277 (1994).
49. Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H. & Thurnheer, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology* (2020) doi:10.1016/j.tim.2020.03.016.
50. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
51. Radovic-Moreno, A. F. *et al.* Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall-Targeted Delivery of Antibiotics. *ACS Nano* **6**, 4279–4287 (2012).
52. Jamal, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* **81**, 7–11 (2018).
53. Johansson, E. M. V. *et al.* Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB. *Chem. Biol.* **15**, 1249–1257 (2008).
54. Hodges, N. A. & Gordon, C. A. Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and beta-lactams by homologous alginate. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 2450–2452 (1991).
55. Simpson, J. A., Smith, S. E. & Dean, R. T. Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 29–36 (1988).

56. Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaoli, S. & Montanaro, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* **5**, (2015).
57. Kaplan, J. B. *et al.* Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 8213–8220 (2004).
58. Cucarella, C. *et al.* Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**, 2177–2185 (2004).
59. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2230–2234 (2010).
60. Lynch, D. J., Fountain, T. L., Mazurkiewicz, J. E. & Banas, J. A. Glucan-Binding Proteins are Essential for Shaping *Streptococcus mutans* Biofilm Architecture. *FEMS Microbiol Lett* **268**, 158–165 (2007).
61. Huseby, M. J. *et al.* Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14407–14412 (2010).
62. Merino, N. *et al.* Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**, 832–843 (2009).
63. Atkins, K. L. *et al.* *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol. Immunol.* **45**, 1600–1611 (2008).
64. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487 (2002).
65. Heijstra, B. D., Pichler, F. B., Liang, Q., Blaza, R. G. & Turner, S. J. Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **95**, 343–349 (2009).
66. Das, T., Sharma, P. K., Krom, B. P., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. Role of eDNA on the adhesion forces between *Streptococcus mutans* and substratum surfaces: influence of ionic strength and substratum hydrophobicity. *Langmuir* **27**, 10113–10118 (2011).
67. Das, T., Krom, B. P., Mei, H. C. van der, Busscher, H. J. & Sharma, P. K. DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid–base interactions. *Soft Matter* **7**, 2927–2935 (2011).
68. Regina, V. R., Lokanathan, A. R., Modrzyński, J. J., Sutherland, D. S. & Meyer, R. L. Surface Physicochemistry and Ionic Strength Affects eDNA's Role in Bacterial Adhesion to Abiotic Surfaces. *PLoS One* **9**, (2014).

69. Sharma, K. & Pagedar Singh, A. Antibiofilm Effect of DNase against Single and Mixed Species Biofilm. *Foods* **7**, (2018).
70. Tetz, V. V. & Tetz, G. V. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol.* **29**, 399–405 (2010).
71. Sugimoto, S. *et al.* Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of Staphylococcus aureus. *Sci Rep* **8**, (2018).
72. Liu, H.-H. *et al.* Role of DNA in bacterial aggregation. *Curr. Microbiol.* **57**, 139–144 (2008).
73. Jones, E. A., McGillivray, G. & Bakaletz, L. O. Extracellular DNA within a Nontypeable Haemophilus influenzae-Induced Biofilm Binds Human Beta Defensin-3 and Reduces Its Antimicrobial Activity. *J Innate Immun* **5**, 24–38 (2013).
74. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. & Lewenza, S. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *PLOS Pathogens* **4**, e1000213 (2008).
75. Abe, K., Nomura, N. & Suzuki, S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* **96**, (2020).
76. von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* **7**, (2016).
77. Schooling, S. R. & Beveridge, T. J. Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. *Journal of Bacteriology* **188**, 5945–5957 (2006).
78. Caruana, J. C. & Walper, S. A. Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. *Front Microbiol* **11**, (2020).
79. Mashburn, L. M. & Whiteley, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**, 422–425 (2005).
80. Elhenawy, W., Debelyy, M. O. & Feldman, M. F. Preferential Packing of Acidic Glycosidases and Proteases into Bacteroides Outer Membrane Vesicles. *mBio* **5**, (2014).
81. Bomberger, J. M. *et al.* Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by Pseudomonas aeruginosa Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathog* **5**, (2009).
82. NIH. NIH Guide: RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS. <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html> (2002).

83. Del Pozo, J. L. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **16**, 51–65 (2018).
84. Darouiche, R. O. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *New England Journal of Medicine* **350**, 1422–1429 (2004).
85. Sandoe, J. A. T. *et al.* Guidelines for the diagnosis, prevention and management of implantable cardiac electronic device infection. Report of a joint Working Party project on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, host organization), British Heart Rhythm Society (BHRS), British Cardiovascular Society (BCS), British Heart Valve Society (BHVS) and British Society for Echocardiography (BSE). *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 325–359 (2015).
86. Lamagni, T. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* **69**, i5–i10 (2014).
87. Wolcott, R. D. *et al.* Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* **19**, 45–46, 48–50, 52–53 (2010).
88. Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R. & Nesse, L. L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)* **9**, (2020).
89. Fazli, M. *et al.* Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 4084–4089 (2009).
90. Hall, C. W. & Mah, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 276–301 (2017).
91. Leekha, S., Terrell, C. L. & Edson, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clin Proc* **86**, 156–167 (2011).
92. Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N. & Song, Z.-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* **7**, 1–7 (2015).
93. Van Acker, H. & Coenye, T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J. Biol. Chem.* **291**, 12565–12572 (2016).
94. Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K. & Okabe, S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4093–4100 (2009).
95. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux* **16**, 112–121 (2014).
96. Tseng, B. S. *et al.* The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* **15**, 2865–2878 (2013).

97. Billings, N. *et al.* The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog* **9**, (2013).
98. Colvin, K. M. *et al.* The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **7**, (2011).
99. Chiang, W.-C. *et al.* Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2352–2361 (2013).
100. Stone, G., Wood, P., Dixon, L., Keyhan, M. & Matin, A. Tetracycline Rapidly Reaches All the Constituent Cells of Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2458–2461 (2002).
101. Boudjema, R. *et al.* New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 4983–4990 (2016).
102. Zheng, Z. & Stewart, P. S. Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 900–903 (2002).
103. Dunne, W. M., Mason, E. O. & Kaplan, S. L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2522–2526 (1993).
104. Baudoux, P. *et al.* Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 246–253 (2007).
105. Zheng, Z. & Stewart, P. S. Growth limitation of *Staphylococcus epidermidis* in biofilms contributes to rifampin tolerance. *Biofilms* **1**, 31–35 (2004).
106. Borriello, G., Richards, L., Ehrlich, G. D. & Stewart, P. S. Arginine or Nitrate Enhances Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 382–384 (2006).
107. Kint, C. I., Verstraeten, N., Fauvart, M. & Michiels, J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* **20**, 577–585 (2012).
108. Harms, A., Maisonneuve, E. & Gerdes, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* **354**, (2016).
109. Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T. & Gerdes, K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 298–309 (2015).

110. Hayes, F. & Van Melderen, L. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 386–408 (2011).
111. Nguyen, D. *et al.* Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982–986 (2011).
112. Miller, C. *et al.* SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science* **305**, 1629–1631 (2004).
113. Bernier, S. *et al.* Starvation, Together With the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS genetics* vol. 9 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23300476/> (2013).
114. Wu, Y., Vulić, M., Keren, I. & Lewis, K. Role of Oxidative Stress in Persister Tolerance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 4922–4926 (2012).
115. Johnson, P. J. T. & Levin, B. R. Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genetics* **9**, e1003123 (2013).
116. Gullberg, E. *et al.* Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens* **7**, e1002158 (2011).
117. Hoffman, L. R. *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171–1175 (2005).
118. Savage, V. J., Chopra, I. & O'Neill, A. J. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1968–1970 (2013).
119. Bae, J., Oh, E. & Jeon, B. Enhanced Transmission of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Biofilms by Natural Transformation. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 7573–7575 (2014).
120. Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.-C. & Re, S. D. The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *mBio* **7**, (2016).
121. Bae, J. & Jeon, B. Increased Emergence of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* in Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5195–5196 (2013).
122. Ryder, V. J., Chopra, I. & O'Neill, A. J. Increased Mutability of *Staphylococci* in Biofilms as a Consequence of Oxidative Stress. *PLOS ONE* **7**, e47695 (2012).
123. Zheng, Y., He, L., Asiamah, T. K. & Otto, M. Colonization of Medical Devices by *Staphylococci*. *Environ Microbiol* **20**, 3141–3153 (2018).

124. Archer, N. K. *et al.* Staphylococcus aureus biofilms. *Virulence* **2**, 445–459 (2011).
125. Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T.-F. & Alarcon, E. I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* **4**, e01067 (2018).
126. Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A. & Ray, P. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog Dis* **74**, (2016).
127. Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C. & Donelli, G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology* **64**, 323–334 (2015).
128. Yadav, M. K., Chae, S.-W., Go, Y. Y., Im, G. J. & Song, J.-J. In vitro Multi-Species Biofilms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa and Their Host Interaction during In vivo Colonization of an Otitis Media Rat Model. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, (2017).
129. Karaman, D. Ş., Manner, S., Fallarero, A. & M. Rosenholm, J. Current Approaches for Exploration of Nanoparticles as Antibacterial Agents. *Antibacterial Agents* (2017) doi:10.5772/68138.
130. Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **33**, 300–305 (2017).
131. Pandey, N. & Cascella, M. Beta Lactam Antibiotics. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
132. Peach, K. C., Bray, W. M., Winslow, D., Linington, P. F. & Linington, R. G. Mechanism of Action-Based Classification of Antibiotics using High-Content Bacterial Image Analysis. *Mol Biosyst* **9**, 1837–1848 (2013).
133. Olivares, E. *et al.* Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections. *Front Microbiol* **10**, (2020).
134. Otani, S. *et al.* Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *J. Infect. Chemother.* **24**, 428–433 (2018).
135. Bala, A., Kumar, R. & Harjai, K. Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *J. Med. Microbiol.* **60**, 300–306 (2011).

136. Molina-Manso, D. *et al.* In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **41**, 521–523 (2013).
137. Szczuka, E., Jabłońska, L. & Kaznowski, A. Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **163**, 712–718 (2017).
138. Rajput, A., Thakur, A., Sharma, S. & Kumar, M. aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. *Nucleic Acids Res* **46**, D894–D900 (2018).
139. Song, F., Koo, H. & Ren, D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J. Dent. Res.* **94**, 1027–1034 (2015).
140. Hook, A. L. *et al.* Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nature Biotechnology* **30**, 868–875 (2012).
141. Somma, A. D., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A. & Duilio, A. Inhibition of Bacterial Biofilm Formation. *Bacterial Biofilms* (2020) doi:10.5772/intechopen.90614.
142. Gimeno, M. *et al.* A controlled antibiotic release system to prevent orthopedic-implant associated infections: An in vitro study. *Eur J Pharm Biopharm* **96**, 264–271 (2015).
143. Kelly, C. G. *et al.* A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nat. Biotechnol.* **17**, 42–47 (1999).
144. Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* **15**, 740–755 (2017).
145. Sambanthamoorthy, K. *et al.* Identification of Small Molecules That Antagonize Diguanylate Cyclase Enzymes To Inhibit Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5202–5211 (2012).
146. Fericola, S. *et al.* In Silico Discovery and In Vitro Validation of Catechol-Containing Sulfonohydrazide Compounds as Potent Inhibitors of the Diguanylate Cyclase PleD. *J Bacteriol* **198**, 147–156 (2015).
147. Ren, Z. *et al.* Molecule Targeting Glucosyltransferase Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 126–135 (2016).
148. Brackman, G. & Coenye, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 5–11 (2015).

149. Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, É. & Daudé, D. Quorum sensing et quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? *Med Sci (Paris)* **35**, 31–38 (2019).
150. Salam, A. M. & Quave, C. L. Targeting Virulence in *Staphylococcus aureus* by Chemical Inhibition of the Accessory Gene Regulator System In Vivo. *mSphere* **3**, e00500-17 (2018).
151. Balaban, N. *et al.* Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection by the Quorum-Sensing Inhibitor RIP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 2226–2229 (2007).
152. Wu, H. *et al.* Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1054–1061 (2004).
153. Fleming, D. & Rumbaugh, K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Scientific Reports* **8**, 10738 (2018).
154. Dobrynina, O. Yu. *et al.* Disruption of bacterial biofilms using recombinant dispersin B. *Microbiology* **84**, 498–501 (2015).
155. Fleming, D., Chahin, L. & Rumbaugh, K. Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
156. Tetz, G. V., Artemenko, N. K. & Tetz, V. V. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1204–1209 (2009).
157. Kaplan, J. B. *et al.* Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)* **65**, 73–77 (2012).
158. Hymes, S. R., Randis, T. M., Sun, T. Y. & Ratner, A. J. DNase Inhibits *Gardnerella vaginalis* Biofilms In Vitro and In Vivo. *J Infect Dis* **207**, 1491–1497 (2013).
159. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* **44**, D1087–D1093 (2016).
160. Lei, J. *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res* **11**, 3919–3931 (2019).
161. Yasir, M., Willcox, M. D. P. & Dutta, D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel)* **11**, (2018).
162. Aka, S. T. Killing efficacy and anti-biofilm activity of synthetic human cationic antimicrobial peptide cathelicidin hCAP-18/LL37 against urinary tract pathogens. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases* **5**, (2015).

163. Overhage, J. *et al.* Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* **76**, 4176–4182 (2008).
164. Li, X.-H. & Lee, J.-H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. *J. Microbiol.* **55**, 753–766 (2017).
165. Malmsten, M., Kasetty, G., Pasupuleti, M., Alenfall, J. & Schmidtchen, A. Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP. *PLoS ONE* **6**, e16400 (2011).
166. Chen, X., Zhang, M., Zhou, C., Kallenbach, N. R. & Ren, D. Control of Bacterial Persister Cells by Trp/Arg-Containing Antimicrobial Peptides ∇ . *Appl Environ Microbiol* **77**, 4878–4885 (2011).
167. Allison, K. R., Brynildsen, M. P. & Collins, J. J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**, 216–220 (2011).
168. Hughes, G. & Webber, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2237–2246 (2017).
169. Gomez, G. F., Huang, R., MacPherson, M., Ferreira Zandona, A. G. & Gregory, R. L. Photo Inactivation of Streptococcus mutans Biofilm by Violet-Blue light. *Curr. Microbiol.* **73**, 426–433 (2016).
170. Dai, T. *et al.* Blue light rescues mice from potentially fatal Pseudomonas aeruginosa burn infection: efficacy, safety, and mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1238–1245 (2013).
171. Chakravarti, A. *et al.* An electrified catheter to resist encrustation by Proteus mirabilis biofilm. *J. Urol.* **174**, 1129–1132 (2005).
172. Presterl, E. *et al.* Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of Staphylococcus epidermidis. *J Antimicrob Chemother* **60**, 417–420 (2007).
173. Liu, H., Wei, X., Ling, J., Wang, W. & Huang, X. Biofilm formation capability of Enterococcus faecalis cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod* **36**, 630–635 (2010).
174. Harper, D. R. *et al.* Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics (Basel)* **3**, 270–284 (2014).
175. Principi, N., Silvestri, E. & Esposito, S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front Pharmacol* **10**, (2019).
176. Pearl, S., Gabay, C., Kishony, R., Oppenheim, A. & Balaban, N. Q. Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol.* **6**, e120 (2008).

177. Yan, J., Mao, J., Mao, J. & Xie, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs* **28**, 265–274 (2014).
178. Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Anggård, E. & Soothill, J. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Vet. Microbiol.* **146**, 309–313 (2010).
179. Jault, P. *et al.* Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* **19**, 35–45 (2019).
180. Morozova, V. V., Kozlova, Y. N., Ganichev, D. A. & Tikunova, N. V. Bacteriophage Treatment of Infected Diabetic Foot Ulcers. *Methods Mol. Biol.* **1693**, 151–158 (2018).
181. Morozova, V. V., Vlassov, V. V. & Tikunova, N. V. Applications of Bacteriophages in the Treatment of Localized Infections in Humans. *Front Microbiol* **9**, (2018).
182. Grassi, L., Maisetta, G., Esin, S. & Batoni, G. Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Front Microbiol* **8**, (2017).
183. Saggiu, S. K., Jha, G. & Mishra, P. C. Enzymatic Degradation of Biofilm by Metalloprotease From *Microbacterium* sp. SKS10. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, (2019).
184. Mishra, N. M. *et al.* Evaluation of the antibacterial and antibiofilm activities of novel CRAMP-vancomycin conjugates with diverse linkers. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 7477–7486 (2015).
185. de la Fuente-Núñez, C. *et al.* D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem. Biol.* **22**, 196–205 (2015).
186. Nair, S., Desai, S., Poonacha, N., Vipra, A. & Sharma, U. Antibiofilm Activity and Synergistic Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms by Bactericidal Protein P128 in Combination with Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 7280–7289 (2016).
187. Wang, Z., de la Fuente-Núñez, C., Shen, Y., Haapasalo, M. & Hancock, R. E. W. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLoS ONE* **10**, e0132512 (2015).
188. Rolain, J.-M., Abat, C., Jimeno, M.-T., Fournier, P.-E. & Raoult, D. Do we need new antibiotics? *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 408–415 (2016).
189. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T* **40**, 277–283 (2015).

190. Sierra, J. M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T. & Viñas, M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy* **17**, 663–676 (2017).
191. Dostert, M., Belanger, C. R. & Hancock, R. E. W. Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application. *J Innate Immun* **11**, 193–204 (2019).
192. Wagener, J. S. & Kupfer, O. Dornase alfa (Pulmozyme). *Curr Opin Pulm Med* **18**, 609–614 (2012).
193. Kaplan, J. B. Biofilm matrix-degrading enzymes. *Methods Mol. Biol.* **1147**, 203–213 (2014).
194. Chen, X. *et al.* Quorum sensing inhibitors: a patent review (2014–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **28**, 849–865 (2018).
195. Forier, K. *et al.* Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release* **190**, 607–623 (2014).
196. Rezaie, H. R., Esnaashary, M., arjmand, A. A. & Öchsner, A. *A Review of Biomaterials and Their Applications in Drug Delivery.* (Springer, 2018).
197. Lee, P. I. & Li, J.-X. Evolution of Oral Controlled Release Dosage Forms. in *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery* 21–31 (John Wiley & Sons, Ltd, 2010). doi:10.1002/9780470640487.ch2.
198. Yun, Y. H., Lee, B. K. & Park, K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J Control Release* **219**, 2–7 (2015).
199. Di Colo, G., Carelli, V., Giannaccini, B., Serafini, M. F. & Bottari, F. Vehicle effects in percutaneous absorption: in vitro study of influence of solvent power and microscopic viscosity of vehicle on benzocaine release from suspension hydrogels. *J Pharm Sci* **69**, 387–391 (1980).
200. Kato, T., Nemoto, R., Mori, H. & Kumagai, I. Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. *Cancer* **46**, 14–21 (1980).
201. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M. & Speiser, P. Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum. *J Pharm Sci* **68**, 1521–1524 (1979).
202. Mahato, R. Chapter 2 - Multifunctional Micro- and Nanoparticles. in *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices* (eds. Mitra, A. K.,

- Cholkar, K. & Mandal, A.) 21–43 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-42978-8.00002-4.
203. Eleraky, N. E., Allam, A., Hassan, S. B. & Omar, M. M. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
204. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **8**, 102 (2013).
205. Patil, Y. P. & Jadhav, S. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* **177**, 8–18 (2014).
206. Sercombe, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol* **6**, (2015).
207. Emami, F., Mostafavi Yazdi, S. J. & Na, D. H. Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particulate carriers for pulmonary drug delivery. *J. Pharm. Investig.* **49**, 427–442 (2019).
208. Lee, B. K., Yun, Y. & Park, K. PLA Micro- and Nano-Particles. *Adv Drug Deliv Rev* **107**, 176–191 (2016).
209. Bolhassani, A. *et al.* Polymeric nanoparticles. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 321–332 (2014).
210. Xiong, M.-H., Bao, Y., Yang, X.-Z., Zhu, Y.-H. & Wang, J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **78**, 63–76 (2014).
211. Nacucchio, M. C., Bellora, M. J., Sordelli, D. O. & D'Aquino, M. Enhanced liposome-mediated activity of piperacillin against staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 137–139 (1985).
212. Salamanca, C. H., Yarce, C. J., Roman, Y., Davalos, A. F. & Rivera, G. R. Application of Nanoparticle Technology to Reduce the Anti-Microbial Resistance through β -Lactam Antibiotic-Polymer Inclusion Nano-Complex. *Pharmaceutics (Basel)* **11**, (2018).
213. Rizvi, S. A. A. & Saleh, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J* **26**, 64–70 (2018).
214. Gao, W., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, Q. & Zhang, L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **127**, 46–57 (2018).
215. Uhl, P. *et al.* Oral delivery of vancomycin by tetraether lipid liposomes. *Eur J Pharm Sci* **108**, 111–118 (2017).

216. Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Gamazo, C., Irache, J. M. & Soudi, M. R. Improved effect of amikacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* **66**, 137–148 (2017).
217. Liu, Y. *et al.* Surface-Adaptive, Antimicrobially Loaded, Micellar Nanocarriers with Enhanced Penetration and Killing Efficiency in Staphylococcal Biofilms. *ACS Nano* **10**, 4779–4789 (2016).
218. Am, R., Je, C. & Mn, J. The specificity and affinity of immunoliposome targeting to oral bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1369**, 278–286 (1998).
219. Robinson, A. M., Creeth, J. E. & Jones, M. N. The use of immunoliposomes for specific delivery of antimicrobial agents to oral bacteria immobilized on polystyrene. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 1381–1393 (2000).
220. Liu, Y. *et al.* Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 428–446 (2019).
221. Nicolosi, D., Scalia, M., Nicolosi, V. M. & Pignatello, R. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 553–558 (2010).
222. Kumar, M., Curtis, A. & Hoskins, C. Application of Nanoparticle Technologies in the Combat against Anti-Microbial Resistance. *Pharmaceutics* **10**, (2018).
223. Abdelghany, S. M. *et al.* Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine* **7**, 4053–4063 (2012).
224. Liu, X.-M. *et al.* Prevention of orthopedic device-associated osteomyelitis using oxacillin-containing biomineral-binding liposomes. *Pharm. Res.* **29**, 3169–3179 (2012).
225. Tan, Y. *et al.* Enhancing antibiofilm activity with functional chitosan nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix. *Carbohydrate Polymers* **200**, 35–42 (2018).
226. Baelo, A. *et al.* Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J Control Release* **209**, 150–158 (2015).
227. Tasia, W. *et al.* Enhanced eradication of bacterial biofilms with DNase I-loaded silver-doped mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale* **12**, 2328–2332 (2020).
228. Patel, K. K. *et al.* Antibiofilm Potential of Silver Sulfadiazine-Loaded Nanoparticle Formulations: A Study on the Effect of DNase-I on Microbial Biofilm and Wound Healing Activity. *Mol. Pharm.* **16**, 3916–3925 (2019).

229. Deacon, J. *et al.* Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *J Control Release* **198**, 55–61 (2015).
230. Fulaz, S., Vitale, S., Quinn, L. & Casey, E. Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in Microbiology* **27**, 915–926 (2019).
231. Wu, J. *et al.* Responsive Assembly of Silver Nanoclusters with a Biofilm Locally Amplified Bactericidal Effect to Enhance Treatments against Multi-Drug-Resistant Bacterial Infections. *ACS Cent Sci* **5**, 1366–1376 (2019).
232. Gao, W., Thamphiwatana, S., Angsantikul, P. & Zhang, L. Nanoparticle Approaches against Bacterial Infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **6**, 532–547 (2014).
233. Liu, D., Yang, F., Xiong, F. & Gu, N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics* **6**, 1306–1323 (2016).
234. Chen, M. *et al.* Bacterial biofilm destruction by size/surface charge-adaptive micelles. *Nanoscale* **11**, 1410–1422 (2019).
235. Forier, K. *et al.* Probing the size limit for nanomedicine penetration into *Burkholderia multivorans* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Control Release* **195**, 21–28 (2014).
236. Rozenbaum, R. T. *et al.* Penetration and Accumulation of Dendrons with Different Peripheral Composition in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Nano Lett.* **19**, 4327–4333 (2019).
237. Wang, L.-S., Gupta, A. & Rotello, V. M. Nanomaterials for the treatment of bacterial biofilms. *ACS Infect Dis* **2**, 3–4 (2016).
238. Hasan, N. *et al.* Bacteria-Targeted Clindamycin Loaded Polymeric Nanoparticles: Effect of Surface Charge on Nanoparticle Adhesion to MRSA, Antibacterial Activity, and Wound Healing. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
239. Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S. & Rotello, V. M. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev* **41**, 2539–2544 (2012).
240. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 5577 (2012).
241. Zhu, X., Radovic-Moreno, A. F., Wu, J., Langer, R. & Shi, J. Nanomedicine in the Management of Microbial Infection – Overview and Perspectives. *Nano Today* **9**, 478–498 (2014).

242. Commissioner, O. of the. FDA approves a new antibacterial drug to treat a serious lung disease using a novel pathway to spur innovation. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-serious-lung-disease-using-novel-pathway-spur-innovation> (2020).
243. Zhang, J. *et al.* Amikacin Liposome Inhalation Suspension (ALIS) Penetrates Non-tuberculous Mycobacterial Biofilms and Enhances Amikacin Uptake Into Macrophages. *Front Microbiol* **9**, (2018).
244. Bilton, D. *et al.* Amikacin liposome inhalation suspension for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **19**, 284–291 (2020).
245. Cipolla, D., Blanchard, J. & Gonda, I. Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections. *Pharmaceutics* **8**, (2016).
246. Haworth, C. S. *et al.* Inhaled liposomal ciprofloxacin in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis and chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* (ORBIT-3 and ORBIT-4): two phase 3, randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* **7**, 213–226 (2019).
247. Rukavina, Z. & Vanić, Ž. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics* **8**, (2016).
248. Zhang, W. *et al.* Big data analysis of global advances in pharmaceuticals and drug delivery 1980-2014. *Drug Discov. Today* **22**, 1201–1208 (2017).
249. Sharma, A., Madhunapantula, S. V. & Robertson, G. P. Toxicological considerations when creating nanoparticle based drugs and drug delivery systems? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, 47–69 (2012).
250. Ventola, C. L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T* **42**, 742–755 (2017).
251. Miernicki, M., T, H., I, E., F, von der K. & A, P. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions. *Nat Nanotechnol* **14**, 208–216 (2019).
252. Thomas, N., Thorn, C., Richter, K., Thierry, B. & Prestidge, C. Efficacy of Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Micro- and Nanoparticles of Ciprofloxacin Against Bacterial Biofilms. *J Pharm Sci* **105**, 3115–3122 (2016).
253. Yeh, Y.-C., Huang, T.-H., Yang, S.-C., Chen, C.-C. & Fang, J.-Y. Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. *Front Chem* **8**, (2020).

254. Piccolomini, R., Catamo, G. & Di Bonaventura, G. Bacteriostatic and bactericidal in vitro activities of clarithromycin and erythromycin against periodontopathic *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3000–3001 (1998).
255. Fuursted, K., Knudsen, J. D., Petersen, M. B., Poulsen, R. L. & Rehm, D. Comparative study of bactericidal activities, postantibiotic effects, and effects of bacterial virulence of penicillin G and six macrolides against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 781–784 (1997).
256. Davidson, R. J. In vitro activity and pharmacodynamic/pharmacokinetic parameters of clarithromycin and azithromycin: why they matter in the treatment of respiratory tract infections. *Infect Drug Resist* **12**, 585–596 (2019).
257. Esfandi, E. ', Ramezani, V., Vatanara, A., Rouholamini Najafabadi, A. & Hadipour Moghaddam, S. P. Clarithromycin Dissolution Enhancement by Preparation of Aqueous Nanosuspensions Using Sonoprecipitation Technique. *Iran J Pharm Res* **13**, 809–818 (2014).
258. Ahmad, I. *et al.* Photodegradation of levofloxacin in aqueous and organic solvents: a kinetic study. *Acta Pharm* **63**, 223–229 (2013).
259. Orisakwe, O. E. & Ofoefule, S. I. Plasma and saliva concentrations of rifampicin in man after oral administration. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **21**, 45–49 (1996).
260. Ikuma, K., Decho, A. W. & Lau, B. L. T. When nanoparticles meet biofilms—interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
261. Keloglu, N., Verrier, B., Trimaille, T. & Sohier, J. Controlled association and delivery of nanoparticles from jet-sprayed hybrid microfibrillar matrices. *Colloids Surf B Biointerfaces* **140**, 142–149 (2016).
262. Coolen, A.-L. Formulation et vectorisation d'un ARN messager vaccinal codant l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique). (Lyon, 2018).
263. Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* **25**, 471–476 (1999).
264. Frick, A., Möller, H. & Wirbitzki, E. Biopharmaceutical characterization of oral immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin. *Eur J Pharm Biopharm* **46**, 305–311 (1998).

265. Agrawal, S., Ashokraj, Y., Bharatam, P. V., Pillai, O. & Panchagnula, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci* **22**, 127–144 (2004).
266. Agrawal, S. & Panchagnula, R. Implication of biopharmaceutics and pharmacokinetics of rifampicin in variable bioavailability from solid oral dosage forms. *Biopharm Drug Dispos* **26**, 321–334 (2005).
267. Tewes, F., Brillault, J., Couet, W. & Olivier, J.-C. Formulation of rifampicin-cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J Control Release* **129**, 93–99 (2008).
268. Chen, Y.-J. The solubility enhancement and the stability assessment of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in aqueous media. (2000).
269. Honary, S. & Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **12**, 255–264 (2013).
270. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* **55**, R1–R4 (1989).
271. Nii-Trebi, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *Biomed Res Int* **2017**, (2017).
272. Costerton, J. W. *et al.* Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**, 2137–2142 (1994).
273. Ceri, H. *et al.* The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol* **37**, 1771–1776 (1999).
274. Catuogno, C. & Jones, M. N. The antibacterial properties of solid supported liposomes on *Streptococcus oralis* biofilms. *Int J Pharm* **257**, 125–140 (2003).
275. Cheow, W. S., Chang, M. W. & Hadinoto, K. Antibacterial Efficacy of Inhalable Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against *E. coli* Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile. *Pharm Res* **27**, 1597–1609 (2010).
276. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* **3**, 1377–1397 (2011).
277. Pinto, R. M. *et al.* Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. *FEMS Microbiol Rev* **43**, 622–641 (2019).

278. Forier, K. *et al.* Transport and delivery of antimicrobial agents in Burkholderia biofilms. *J Control Release* **148**, e35-36 (2010).
279. Messiaen, A.-S., Forier, K., Nelis, H., Braeckmans, K. & Coenye, T. Transport of nanoparticles and tobramycin-loaded liposomes in Burkholderia cepacia complex biofilms. *PLoS ONE* **8**, e79220 (2013).
280. Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q. & Gangloff, C. M. and S. C. Staphylococcus aureus Biofilms and their Impact on the Medical Field. *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus* (2017) doi:10.5772/66380.
281. Martínez Rivas, C. J. *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **532**, 66–81 (2017).
282. Lamrayah, M. *et al.* Molecular modelling of TLR agonist Pam3CSK4 entrapment in PLA nanoparticles as a tool to explain loading efficiency and functionality. *Int J Pharm* **568**, 118569 (2019).
283. Radovic-Moreno, A. F. *et al.* Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano* **6**, 4279–4287 (2012).
284. DeLeon, S. *et al.* Synergistic Interactions of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in an In Vitro Wound Model. *Infect Immun* **82**, 4718–4728 (2014).
285. Groot, R. D. & Rabone, K. L. Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants. *Biophys J* **81**, 725–736 (2001).
286. Groot, R. D. & Warren, P. B. Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation. *J. Chem. Phys.* **107**, 4423–4435 (1997).
287. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3**, 163–175 (2008).
288. Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. & Kaplan, J. B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 470–476 (2008).
289. Skogman, M. E., Vuorela, P. M. & Fallarero, A. Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against Staphylococcus aureus biofilms. *J Antibiot* **65**, 453–459 (2012).
290. Skogman, M. E., Vuorela, P. M. & Fallarero, A. A Platform of Anti-biofilm Assays Suited to the Exploration of Natural Compound Libraries. *J Vis Exp* (2016) doi:10.3791/54829.

291. Haney, E. F., Trimble, M. J., Cheng, J. T., Vallé, Q. & Hancock, R. E. W. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules* **8**, (2018).
292. Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G. & Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* **9**, 522–554 (2017).
293. Darrene, L.-N. & Cecile, B. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. *BioMed Research International* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7461047/> (2016)
doi:<https://doi.org/10.1155/2016/7461047>.
294. Tasse, J. *et al.* Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram[®]. *Pathog Dis* **74**, (2016).
295. Traba, C. & Liang, J. F. Susceptibility of Staphylococcus aureus biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling* **27**, 763–772 (2011).
296. Fleming, D. & Rumbaugh, K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Scientific Reports* **8**, 10738 (2018).
297. Stavrakis, A. I. *et al.* Combination prophylactic therapy with rifampin increases efficacy against an experimental Staphylococcus epidermidis subcutaneous implant-related infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2377–2386 (2014).
298. Nowakowska, J., Landmann, R. & Khanna, N. Foreign Body Infection Models to Study Host-Pathogen Response and Antimicrobial Tolerance of Bacterial Biofilm. *Antibiotics (Basel)* **3**, 378–397 (2014).
299. Kadurugamuwa, J. L. *et al.* Direct Continuous Method for Monitoring Biofilm Infection in a Mouse Model. *Infect Immun* **71**, 882–890 (2003).
300. Greimel, F. *et al.* Efficacy of antibiotic treatment of implant-associated Staphylococcus aureus infections with moxifloxacin, flucloxacillin, rifampin, and combination therapy: an animal study. *Drug Des Devel Ther* **11**, 1729–1736 (2017).
301. Kristian, S. A. *et al.* Biofilm Formation Induces C3a Release and Protects Staphylococcus epidermidis from IgG and Complement Deposition and from Neutrophil-Dependent Killing. *J Infect Dis* **197**, 1028–1035 (2008).
302. von Köckritz-Blickwede, M. *et al.* Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe Staphylococcus aureus infection in the mouse model. *Am. J. Pathol.* **173**, 1657–1668 (2008).

303. Hu, Y. *et al.* Combinatory antibiotic therapy increases rate of bacterial kill but not final outcome in a novel mouse model of *Staphylococcus aureus* spinal implant infection. *PLoS One* **12**, (2017).
304. Delcour, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 808–816 (2009).
305. Berthet, M. Nanoparticules biodégradables et multifonctionnelles pour la régénération tissulaire de plaies cutanées profondes. (Lyon, 2017).
306. Megy, S. *et al.* Molecular Dynamics Studies of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles and Their Interactions with Vitamin E and TLR Agonists Pam1CSK4 and Pam3CSK4. *Nanomaterials* **10**, 2209 (2020).
307. Kamaraj, N., Rajaguru, P. Y., Issac, P. kumar & Sundaresan, S. Fabrication, characterization, in vitro drug release and glucose uptake activity of 14-deoxy, 11, 12-didehydroandrographolide loaded polycaprolactone nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* **12**, 353–362 (2017).
308. Sitterberg, J., Özçetin, A., Ehrhardt, C. & Bakowsky, U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **74**, 2–13 (2010).
309. Maghrebi, S., Joyce, P., Jambhrunkar, M., Thomas, N. & Prestidge, C. A. Poly(lactic-co-glycolic) Acid-Lipid Hybrid Microparticles Enhance the Intracellular Uptake and Antibacterial Activity of Rifampicin. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 8030–8039 (2020).
310. Lee, M. Y. *et al.* Microencapsulation of rifampicin for the prevention of endophthalmitis: In vitro release studies and antibacterial assessment. *Int J Pharm* **505**, 262–270 (2016).
311. Liu, Z. *et al.* A novel and simple preparative method for uniform-sized PLGA microspheres: Preliminary application in antitubercular drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* **145**, 679–687 (2016).
312. Esmaili, F. *et al.* Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**, 161–167 (2007).
313. Pandey, R., Zahoor, A., Sharma, S. & Khuller, G. K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 373–378 (2003).

314. Kalluru, R. *et al.* Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes. *J. Cell. Sci.* **126**, 3043–3054 (2013).
315. Rani, S. *et al.* HPMA-PLGA Based Nanoparticles for Effective In Vitro Delivery of Rifampicin. *Pharm. Res.* **36**, 19 (2018).
316. Fazly Bazzaz, B. S., Khameneh, B., Zarei, H. & Golmohammadzadeh, S. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Microb. Pathog.* **93**, 137–144 (2016).
317. Yang, J. & Kopeček, J. The Light at the End of the Tunnel-Second Generation HPMA Conjugates for Cancer Treatment. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **31**, 30–42 (2017).
318. Kim, M.-H. Nanoparticle-Based Therapies for Wound Biofilm Infection: Opportunities and Challenges. *IEEE Trans Nanobioscience* **15**, 294–304 (2016).
319. Reiter, K. C. *et al.* Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**, 471–474 (2012).
320. Bekhouche, M. *et al.* Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *J. Mater. Chem. B* (2020) doi:10.1039/D0TB00989J.
321. Ramu, C. & Padmanabhan, T. Indications of antibiotic prophylaxis in dental practice-Review. *Asian Pac J Trop Biomed* **2**, 749–754 (2012).
322. Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R. & Bayles, K. W. Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio* **5**, (2014).
323. Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A. S. & Losick, R. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **197**, 3779–3787 (2015).